

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 10 月 6 日 (06.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/093057 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, A61K 38/46, 45/00, 48/00, A61P 9/00, 9/10, 11/00, 17/00, 17/02, 43/00, C07K 14/47, 16/18, C12N 9/64, C12P 21/08, C12Q 1/26, 1/37, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/556

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/004274

(22) 国際出願日: 2005 年 3 月 4 日 (04.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-096685 2004 年 3 月 29 日 (29.03.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP];
〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
Kyoto (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中邨 智之 (NAKA-
MURA, Tomoyuki) [JP/JP]; 〒6038435 京都府京都市北
区紫竹栗栖町 2 3 - 2 Kyoto (JP). 平井 希俊 (HIRAI,
Maretoshi) [JP/JP]; 〒6068341 京都府京都市左京区岡
崎西天王町 7 9 - 1 - 2 0 4 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044
大阪府大阪市中央区伏見町四丁目 1 番 1 号 明治安
田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: TRUNCATED DANCE, DANCE COMPLEX AND METHOD OF USING THESE

(54) 発明の名称: 切断型 DANCE、DANCE 複合体、及びこれらを用いる方法

(57) Abstract: A method of screening that enables development of a medicine realizing a novel mechanism of action capable of regulating of generation of an elastic fibrous tissue; and various means that are requisite for the method. In particular, there are provided a polypeptide obtained by cleaving of DANCE and a polynucleotide coding for the polypeptide; a method of cleaving DANCE; an antibody against the polypeptide obtained by cleaving of DANCE; a method of measuring the amount of DANCE cleavage and a kit therefor; a DANCE variant and polynucleotide coding for the same; various DANCE complexes and a method of preparing the same; a method of screening a substance capable of regulating the activity of DANCE or a DANCE-specific protease, and a substance obtained by the screening method; an agent for regulating of generation of an elastic fibrous tissue; a kit comprising at least DANCE and a polynucleotide coding for the same; etc.

(57) 要約: 本発明は、弾性線維形成を調節し得る新たな作用機序を有する医薬の開発を可能にするスクリーニング方法、当該方法に必要な種々の手段を提供する。より具体的には、本発明は、DANCE の切断により得られるポリペプチド及びそれをコードするポリヌクレオチド; DANCE の切断方法; DANCE の切断により得られるポリペプチドに対する抗体; DANCE 切断量の測定方法・キット; DANCE 変異体及びそれをコードするポリヌクレオチド; 種々の DANCE 複合体及びその調製方法; DANCE の活性を調節し得る物質又は DANCE 特異的プロテアーゼのスクリーニング方法、及びそれにより得られる物質; 弾性線維形成調節剤; 並びに DANCE 及びそれをコードするポリヌクレオチドを少なくとも含むキットなどを提供する。

WO 2005/093057 A1

明 細 書

切断型DANCE、DANCE複合体、及びこれらを用いる方法

技術分野

本発明は、DANCEの切断により得られるポリペプチド及びそれをコードする
5 ポリヌクレオチド；DANCEの切断方法；DANCEの切断により得られる
ポリヌクレオチドに対する抗体；DANCE切断量の測定方法・キット；DANCE
変異体及びそれをコードするポリヌクレオチド；種々のDANCE複合体及び
その調製方法；DANCEの活性を調節し得る物質又はDANCE特異的プロ
テアーゼのスクリーニング方法、及びそれにより得られる物質；弾性線維形成調
10 節剤；並びにDANCE及びそれをコードするポリヌクレオチドを少なくとも含
むキットなどに関する。

背景技術

弾性線維は、肺・動脈・皮膚等の伸縮性組織に富む、組織の弾性を担う細胞外
線維である。ヒトの老化の大きな特徴は、組織の弾性の喪失であり、これにより
15 肺気腫、動脈の硬化と蛇行、皮膚のたるみ等が生じる。これらは高齢化社会にお
いて重要性を増している課題であるが、その多くは弾性線維の劣化・断裂が原因
である。弾性線維の重要性にもかかわらず、弾性線維の形成および劣化の分子機
構に関する詳細は依然として不明である。

弾性線維の形成時には、ミクロフィブリルとよばれる線維に沿ってエラスチン
20 が沈着し、リシルオキシダーゼファミリーの酵素〔リシルオキシダーゼ (lysyl
oxidase: LOX)、リシルオキシダーゼ様 (lysyl oxidase-like: LOXL) 1
ー4〕によりエラスチンがクロスリンクされることが重要である (Molnar, J. ら,
Biochim Biophys Acta 1647: 220-4 (2003)、Rosenbloom, J. ら, Faseb J. 7: 1208-18.
(1993))。しかしこの手順がどのような分子機構に基づき生体内で行われているの
25 かについてわかっていることは少ない。また、ミクロフィブリルの本体はフィブ
リリン1、フィブリリン2、LTBP2 (latent TGFb-binding protein 2) とい
った細長い高分子量タンパク質であると言われているが、フィブリリン1, フィ

ブリリン2遺伝子のノックアウトマウスはいずれも弾性線維に異常が無いためこれらタンパク質の弾性線維形成への寄与は考えにくく (Pereira, L. ら, Nat. Genet. 17: 218-22 (1997)、Putnam, E. A. ら, Nat. Genet. 11: 456-8 (1995)、Chaudhry, S. S ら, Mol. Genet. 10: 835-43 (2001))、LTBP2 遺伝子のノックアウトマウスは胎生早期致死であるため、LTBP2 が弾性線維形成に寄与しているかどうかは不明である (Shipley, J. M. ら, Mol. Cell Biol. 20: 4879-87 (2000))。

本発明者らは、Signal Sequence Trap 法を用いてDANCE (developmental arteries and neural crest epidermal growth factor (EGF)-like; fibulin-5 ともいう) という分泌タンパク質をクローニングし (Nakamura, T. ら, J. Biol. Chem. 274: 22476-83 (1999))、そのノックアウトマウスを作成したところ、全身の弾性線維がバラバラになっていることを見出した (Nakamura, T. ら, Nature 415: 171-5 (2002))。このためDANCE遺伝子欠損マウスの表現型はヒトの老化に非常に類似しており、皮膚は弾性が無くたるみ、重度の肺気腫をきたし、動脈は蛇行して硬化していた。すなわち、DANCEは弾性線維形成に必須のタンパク質である。また、本発明者らは、DANCEのインテグリンへの結合が生体において重要な役割を果たし得ることを明らかにしている (Nakamura, T. ら, J. Biol. Chem. 274: 22476-83 (1999))。

最近、エラスチンをクロスリンクする酵素のひとつ、LOXL1のノックアウトマウスはDANCEノックアウトマウスとよく似て弾性線維の形成異常をきたすことが報告された (Liu, X. ら, Nat. Genet. 36: 178-82 (2004))。LOXL1はDANCEと結合すること、DANCEノックアウトマウスではLOXL1は弾性線維上に局在しなくなることから、DANCEはLOXL1酵素をしかるべき位置につなぎ止めておくアダプターとして働くと推測される。LOXL1ノックアウトマウスの表現型はDANCEノックアウトマウスの表現型よりも弱く、やや遅れて出現するため、DANCEの役割はLOXL1をつなぎ止めるだけではないと考えられるが、DANCEがエラスチンクロスリンク酵素の局在を規定

するという知見は、DANCEが弾性線維形成に寄与する分子機構を理解する上で重要である。

しかし、弾性線維がマイクロフィブリルに沿って形成されることを考えると、DANCEがエラスチンクロスリンク酵素と結合するだけでは不十分で、DANCEがマイクロフィブリルの構成タンパク質と結合することが必要であると考えられる。しかしながら、DANCEがマイクロフィブリルのどのタンパクと結合するのかは依然として不明のままである。DANCEの詳細な機能が明らかになれば、弾性線維形成を調節し得る新たな作用機序を有する医薬の開発が可能になると考えられるため、その機能の解明が切望されている。

10

発明の開示

従って、本発明は、DANCEの機能の一端を解明することにより、当該解明された機能を利用して、弾性線維形成を調節し得る医薬の開発を可能とするスクリーニング方法、弾性線維形成の状態についての診断方法、当該スクリーニング方法及び診断方法に必要な種々の手段を提供することなどを目的とする。

15

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、DANCEの一部が生体内で切断されて機能変化をおこすことを見出した。切断型DANCEは、細胞表面インテグリンとの結合能、DANCE同士の結合能を失い、マイクロフィブリルの構成タンパク質であるLTBP2に対するより強い結合能を獲得する。従って、DANCEの切断は弾性線維形成の調節に重要であると考えられる。

20

また、本発明者らは、DANCEがLTBP2と結合すること、DANCE同士が結合すること、DANCEがリシルオキシダーゼに結合することなどを見出した。DANCEのこれらタンパク質への結合は弾性線維形成の調節に重要であると考えられる。

本発明者らは、以上の知見に基づき本発明を完成した。即ち、本発明は下記の通りである：

25

<1>配列番号6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなる、DANCE特異的プロテアーゼによるDANCEの切断により得られるポリ

ペプチド。

< 2 > 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

< 3 > 上記< 1 >のポリペプチドをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

5 < 4 > 配列番号 5 で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド。

< 5 > 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなる、DANCE 特異的プロテアーゼによる DANCE の切断により得られるポリペプチド。

< 6 > 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

10 < 7 > 上記< 5 >のポリペプチドをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

< 8 > 配列番号 7 で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド。

< 9 > DANCE を DANCE 特異的プロテアーゼに接触させることを特徴とする、DANCE の切断方法。

15 < 10 > 上記< 1 >又は< 2 >のポリペプチドに特異的親和性を有する抗体。

< 11 > 上記< 5 >又は< 6 >のポリペプチドに特異的親和性を有するモノクローナル抗体。

< 12 > 動物由来の生体試料において DANCE の切断量を測定することを特徴とする方法。

20 < 13 > 抗 DANCE 抗体を含有することを特徴とする、DANCE の切断量の測定用キット。

< 14 > DANCE 特異的プロテアーゼによる DANCE の切断部位に、当該プロテアーゼに抵抗性を示すようにアミノ酸変異が導入されている、DANCE 変異体。

25 < 15 > 上記< 14 >のポリペプチドをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

< 16 > 少なくとも 2 つの DANCE を含んでなる DANCE 複合体。

< 1 7 > 識別可能な形態である少なくとも 2 種類の DANCE を含んでなる、上記 < 1 6 > の複合体。

< 1 8 > リシルオキシダーゼ及び／又は LTBP 2 をさらに含んでなる上記 < 1 6 > 又は < 1 7 > の複合体。

- 5 < 1 9 > 少なくとも 1 つの DANCE、並びにリシルオキシダーゼ及び／又は LTBP 2 を含んでなる DANCE 複合体。

< 2 0 > 少なくとも 2 つの DANCE を接触させ、複合体を形成させることを特徴とする、少なくとも 2 つの DANCE を含んでなる DANCE 複合体の調製方法。

- 10 < 2 1 > 少なくとも 1 つの DANCE をリシルオキシダーゼ及び／又は LTBP 2 に接触させ、複合体を形成させることを特徴とする、少なくとも 1 つの DANCE、並びにリシルオキシダーゼ及び／又は LTBP 2 を含んでなる DANCE 複合体の調製方法。

< 2 2 > 以下の工程 (a)、(b) 及び (c) を含む、DANCE 特異的プロテアーゼの活性を調節し得る物質のスクリーニング方法：

- 15 (a) 被検物質を、DANCE 特異的プロテアーゼに接触させる工程；
 (b) 上記 (a) の工程に起因して生じる DANCE 特異的プロテアーゼの活性を測定し、該活性を被検物質を接触させない場合の DANCE 特異的プロテアーゼの活性と比較する工程；
20 (c) 上記 (b) の比較結果に基づいて、DANCE 特異的プロテアーゼの活性の調節をもたらす被検物質を選択する工程。

< 2 3 > 弾性線維形成調節剤を同定するための方法である、上記 < 2 2 > の方法。

< 2 4 > 以下の工程 (a)、(b) 及び (c) を含む、DANCE 特異的プロテアーゼの活性を調節し得る物質のスクリーニング方法：

- 25 (a) 被検物質を動物に投与する工程；
 (b) 上記 (a) の工程に起因して生じる DANCE 特異的プロテアーゼの活性を測定し、該活性を被検物質を投与しない場合の DANCE 特異的プロテアーゼ

の活性と比較する工程；

(c) 上記 (b) の比較結果に基づいて、DANCE 特異的プロテアーゼの活性の調節をもたらす被検物質を選択する工程。

5 < 25 > 以下の工程 (a)、(b) 及び (c) を含む、少なくとも 2 つの DANCE を含んでなる DANCE 複合体の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法：

(a) 被検物質の存在下、少なくとも 2 つの DANCE を接触させる工程；

(b) 上記 (a) の工程に起因して生じる DANCE 複合体の量を測定し、該量を被検物質の不在下における DANCE 複合体の量と比較する工程；

10 (c) 上記 (b) の比較結果に基づいて、DANCE 複合体の形成を調節する被検物質を選択する工程。

< 26 > 識別可能な形態である少なくとも 2 種類の DANCE を用いる、上記 < 25 > の方法。

15 < 27 > 以下の工程 (a)、(b) 及び (c) を含む、少なくとも 1 つの DANCE、並びにリシルオキシダーゼ及び／又は LTBP 2 を含んでなる DANCE 複合体の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法：

(a) 被検物質の存在下、少なくとも 1 つの DANCE をリシルオキシダーゼ及び／又は LTBP 2 に接触させる工程；

20 (b) 上記 (a) の工程に起因して生じる DANCE 複合体の量を測定し、該量を被検物質の不在下における DANCE 複合体の量と比較する工程；

(c) 上記 (b) の比較結果に基づいて、DANCE 複合体の形成を調節する被検物質を選択する工程。

< 28 > 上記 < 23 > ～ < 27 > のいずれかの方法により得られる弾性線維形成調節剤。

25 < 29 > DANCE の切断活性を指標とする、DANCE 特異的プロテアーゼのスクリーニング方法。

< 30 > 上記 < 29 > の方法により得られる DANCE 特異的プロテアーゼ。

< 3 1 > 上記 < 2 9 > の方法により得られる DANCE 特異的プロテアーゼをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

< 3 2 > 上記 < 3 0 > の DANCE 特異的プロテアーゼ、又は上記 < 3 1 > のポリヌクレオチドを含有する弾性線維形成調節剤。

5 < 3 3 > 以下 (a) 及び (b) を含むキット：

 (a) DANCE、又は DANCE をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド；

 (b) 以下 (i) ～ (v i) の少なくとも 1 つの成分；

 (i) (a) の DANCE と識別可能な形態の DANCE ；

10 (i i) (a) の DANCE と識別可能な形態の DANCE をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド；

 (i i . i) リシルオキシダーゼ；

 (i v) リシルオキシダーゼをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド；

 (v) LTBP 2 ；

15 (v i) LTBP 2 をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

< 3 4 > 以下の工程 (a) ～ (b) を含む、DANCE 特異的プロテアーゼ発現細胞の同定方法：

 (a) 所定の動物細胞と DANCE とを接触させる工程；

 (b) DANCE が切断されるか否かを評価する工程。

20 本発明のスクリーニング方法は、弾性線維形成を調節し得る新規作用機序の医薬の開発、又は DANCE 特異的プロテアーゼの同定を可能にするため有用である。また、本発明の測定方法は、弾性線維形成の状態の診断を可能とするため有用である。さらに、本発明のポリペプチド、複合体及びキットは、本発明の方法を行うため、弾性線維形成の調節が所望される状態の予防、治療又は改善のため、

25 あるいは研究・診断用試薬などとして好適に用いられる。

図面の簡単な説明

図 1 は、DANCE 欠失変異体のコンストラクトを示す。横線ボックス：シグ

ナル配列；白ボックス：カルシウム結合性EGF様（c b E G F）モチーフ；黒ボックス：RGDモチーフ；縦線ボックス：C末端ドメイン；斜線ボックス：FLAGタグ。

図2は、293T細胞でのヒト、マウスDANCEの強制発現を示す。

5 図3は、マウス皮膚線維芽細胞の培養上清におけるDANCEの発現を示す。

図4は、マウス肺組織のウエスタンブロッティングを示す。

図5は、全長DANCE、N末端切断DANCEの精製を示す。

図6は、セリンプロテアーゼインヒビターによるDANCEの切断阻害を示す。

10 図7は、インビトロ培養物におけるヒトDANCEの切断部位、及び変異型DANCEのアミノ酸変異部位を示す。

図8は、変異型DANCE（R77A）によるDANCE切断量の低下を示す。

図9は、平滑筋細胞培養物におけるDANCE結合タンパク質を示す。

図10は、DANCE欠失変異体を用いた、DANCE同士の結合、DANCEとLTBP2の結合に必要な領域の解析を示す。

15 図11は、DANCEとリシルオキシダーゼの結合を示す。

図12は、種々の年齢のヒトの皮膚におけるDANCE蛋白質の発現を示す。

Ba：背部；F：顔面；N：頸部；Bu：臀部；T：口唇・腫瘍摘出時の余剰皮膚（炎症有り）

20 図13は、DANCEの変異蛋白質の血管内皮細胞に対する細胞接着アッセイの結果を示す。

発明の詳細な説明

1. 切断型DANCE、及びそれをコードするポリヌクレオチド

本発明は、DANCE特異的プロテアーゼによるDANCEの切断により得られるポリペプチド、当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。

25 「DANCE」とは、配列番号2で表されるアミノ酸配列、又は配列番号4で表されるアミノ酸配列（配列番号2で表されるアミノ酸配列から推定シグナル配列を除いたアミノ酸配列）からなるポリペプチド、又はそれらの均等物（例えば、

SNP、ハプロタイプを含むバリエーション、哺乳動物オルソログなど)をいう。具体的には、配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの均等物は、配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、且つDANCE特異的プロテアーゼにより切断されるポリペプチドである。本発明では、このようなDANCEがDANCE特異的プロテアーゼにより切断されることを発見し、この知見に基づきDANCEの切断により得られる新規ポリペプチドを提供することに成功した。

DANCEの哺乳動物オルソログは特に限定されるものではないが、例えばウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、サル、ウサギ、ラット、ハムスター、モルモット、及びマウスのオルソログが好ましく、ヒト、サル、ラットまたはマウスのオルソログがより好ましい。

本明細書中、「DANCE特異的プロテアーゼ」とは、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるDANCEにおいて77番目のアミノ酸と78番目のアミノ酸との間を切断するプロテアーゼをいう。DANCE特異的プロテアーゼは、セリンプロテアーゼインヒビターであるアプロチニンにより阻害され、システインプロテアーゼインヒビターであるE64により阻害されないという特徴を有する。また、DANCE特異的プロテアーゼは、皮膚線維芽細胞、293T細胞、肺組織などでの発現が確認されている。さらにDANCE特異的プロテアーゼは、77番目のアルギニン残基をアラニン残基に置換した変異型DANCEに対する切断能の低下が確認されている。

従って、かかるDANCE特異的プロテアーゼによるDANCEの切断により得られる本発明のポリペプチドの一方は、配列番号2で表されるアミノ酸配列において24番目から77番目に相当するアミノ酸配列(即ち、配列番号6で表されるアミノ酸配列)からなるポリペプチド、又はその均等物である。具体的には、配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの均等物は、配列番号6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

また、本発明により提供されるDANCEの切断により生成する別のポリペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列において78番目から448番目に相当するアミノ酸配列（即ち、配列番号8で表されるアミノ酸配列）からなるポリペプチド、又はその均等物である。具体的には、配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの均等物は、配列番号8で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

配列番号6又は配列番号8で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、配列番号6又は配列番号8に示されるアミノ酸配列において1もしくは2以上（例えば1～30個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、最も好ましくは1～5個）のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列である。

また、配列番号6又は配列番号8で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列として、配列番号6又は8に示されるアミノ酸配列に対して約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらにより好ましくは約95%以上、いっそうより好ましくは約97%以上、最も好ましくは99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を用いることもできる。同一性(%)は、当該分野で慣用のプログラム（例えば、BLAST、FASTA等）を初期設定で用いて決定することができる。また、別の局面では、同一性(%)は、当該分野で公知の任意のアルゴリズム、例えば、Needlemanら(1970) (J. Mol. Biol. 48: 444-453)、Myers及びMiller (CABIOS, 1988, 4: 11-17)のアルゴリズム等を使用して決定することができる。Needlemanらのアルゴリズムは、GCGソフトウェアパッケージ (www.gcg.comで入手可能)のGAPプログラムに組み込まれており、同一性(%)は、例えば、BLOSUM 62 matrix 又は PAM250 matrix、並びに gap weight: 16、14、12、10、8、6 若しくは 4、及び length weight: 1、2、3、4、5 若しくは 6 のいずれかを使用することによって決定することができる。また、Myers及びMillerのアルゴリズムは、GCG 配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部である ALIGN プログラムに組み込まれている。アミノ酸配列を比較するために ALIGN プ

ログラムを利用する場合、例えば、PAM120 weight residue table、gap length penalty 12、gap penalty 4 を用いることができる。

また、配列番号 6 又は配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、それぞれ、配列番号 6 又は配列番号 8 で表
5 されるアミノ酸配列からなるポリペプチドと同質の活性（ここで、「活性」とは機能と同義とする）を保持していることが好ましい。「同質の活性」とは活性が定性的に同等であることを意味し、定量的にも同等であることが好ましいが、許容し得る範囲（例えば、約 0.5 ～ 約 2 倍）で異なってもよい。

配列番号 6 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドと同質の活性として
10 は、例えば、インテグリン結合活性、ホモ複合体形成活性（換言すれば、DANC E 間の結合活性）が挙げられる。従って、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、好ましくは、インテグリン結合部位であるコンセンサス A r g - G l y - A s p (R G D) モチーフ（配列番号 6 で表されるアミノ酸配列において 31 番目～33 番目に相当するアミノ
15 酸配列）、及び／又はホモ複合体形成部位を保持することが好ましい。ホモ複合体形成部位の正確な位置は、欠失解析等の自体公知の方法により同定できる。

配列番号 6 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドの好適な例としては、配列番号 10 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド（マウスオルソログ）、配列番号 14 で表されるアミノ酸配列からな
20 るポリペプチド（ラットオルソログ）が挙げられる。

配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドと同質の活性としては、例えば、リシルオキシダーゼ結合活性、リシルオキシダーゼ様-1 結合活性、L T B P 2 結合活性などが挙げられる。従って、配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、好ましくは、リシ
25 ルオキシダーゼ結合部位、リシルオキシダーゼ様-1 (lysyl oxidase-like 1) 結合部位、L T B P 2 (Latent TGF- β -binding protein 2) 結合部位の少なくとも 1 以上、好ましくは 2 以上、より好ましくは全てを保持することが好ましい。

例えば、LTBP 2 結合部位は、DANCE の中央にあるカルシウム結合性 EGF (c b EGF) 様モチーフ [代表的には、 $(D/N) X (D/N) (E/Q) X_m (D/N)^* X_n (Y/F)$: ここで、 m 、 n は変数であり、アスタリスクは β 水酸化を示す] が連続するドメインに存在すると考えられるが (例えば、実施例 6 参

5 照)、リシルオキシダーゼ結合部位、リシルオキシダーゼ様-1 結合部位、LTBP 2 結合部位のより正確な位置は、欠失解析等の自体公知の方法により同定できる。

配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドの好適な例としては、配列番号 12 で表されるアミノ酸配列からなる

10 ポリペプチド (マウスオルソログ)、配列番号 16 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド (ラットオルソログ) が挙げられる。

本発明はまた、配列番号 6 又は配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド又はその均等物をコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドは、DNA 又は RNA のいずれでもよい。

15 配列番号 6 又は配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの好適な例としては、配列番号 5 又は配列番号 7 で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドが挙げられる。

別の局面では、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの均等物をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 5 で表される塩基配列の相補配

20 列に対してハイストリンジェント (high stringent) 条件下でハイブリダイズするが、配列番号 7 で表される塩基配列の相補配列に対してハイストリンジェント条件 (好ましくは、中程度 (moderate) のストリンジェント条件) 下でハイブリダイズしないポリヌクレオチドである。

また、配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの均等物をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 7 で表される塩基配列の相補配列に対し

25 てハイストリンジェント条件下でハイブリダイズするが、配列番号 5 で表される塩基配列の相補配列に対してハイストリンジェント条件 (好ましくは、中程度の

ストリンジェント条件)下でハイブリダイズしないポリヌクレオチドであり得る。

上記ハイブリダイゼーションの条件は、既報の条件を参考に設定することができる (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 6.3.1-6.3.6, 1999)。例えば、ハイストリンジェント条件下でのハイブリダイゼーションの条件
5 としては、 $6\times\text{SSC}$ (sodium chloride/sodium citrate) / 45°C の後、 $0.2\times\text{SSC}/0.1\%\text{SDS}$ / $50\sim 65^{\circ}\text{C}$ での一回以上の洗浄が挙げられる。また、中程度のストリンジェント条件下でのハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、 $2\times\text{SSC}/30^{\circ}\text{C}$ の後、 $1\times\text{SSC}/0.1\%\text{SDS}$ / $30\sim 50^{\circ}\text{C}$ での1回以上洗浄が挙げられる。

配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの均等物をコードする
10 ポリヌクレオチドの好適な例としては、配列番号9で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド (マウスオルソログ)、配列番号13で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド (ラットオルソログ) が挙げられる。

配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの均等物をコードする
15 ポリヌクレオチドの好適な例としては、配列番号11で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド (マウスオルソログ)、配列番号15で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド (ラットオルソログ) が挙げられる。

2. 切断型DANCE、及びそれをコードするポリヌクレオチドの作製方法

2. 1. 非切断方法

本発明のポリヌクレオチドは、自体公知の方法により作製できる。例えば、配
20 列番号6又は配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、その発現部位 (例えば、心臓、卵巣、結腸など) から総RNAを抽出し、mRNAからcDNAを調製した後、適切なプライマーを用いてPCRを行うことによりクローニングできる。また、配列番号6又は配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの均等物をコードするポリヌ
25 クレオチドは、上記の通りクローニングしたポリヌクレオチドに変異を導入することにより作製できる。変異導入法としては、例えば、合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入法 (gapped duplex) 法、ランダムに点突然変異を導入する方法

(例えば、亜硝酸若しくは亜硫酸での処理)、カセット変異法、リンカースキニング法、ミスマッチプライマー法などの方法が挙げられる。

また、本発明のポリペプチドについても自体公知の方法により作製できる。例えば、上記のように作製した本発明のポリヌクレオチドを発現ベクターに組み込み、得られた組換えベクターを適切な宿主細胞に導入して形質転換体を得た後、形質転換体を培養し、本発明のポリペプチドを産生させ、次いで回収すればよい。本発明はまた、このような組換えベクター、及び当該ベクターが導入された形質転換体をも提供する。

発現ベクターとしては、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主細胞中で本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を発現し、これらポリペプチドを産生できるものであれば特に制限されない。例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス）等を挙げることができる。

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくともプロモーター・オペレーター領域、開始コドン、本発明のポリペプチドをコードする DNA、終止コドン、ターミネーター領域および複製可能単位から構成される。

宿主として酵母、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合、発現ベクターは少なくともプロモーター、開始コドン、本発明のポリペプチドをコードする DNA、終止コドンを含んでいることが好ましい。また、エンハンサー配列、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の 5' 側および 3' 側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、選択マーカー領域または複製可能単位などを含んでいてもよい。また、目的に応じて通常用いられる遺伝子増幅遺伝子（マーカー）を含んでいてもよい。

細菌中で本発明のポリペプチドを発現させるためのプロモーター・オペレーター領域は、プロモーター、オペレーター及び Shine-Dalgarno (SD) 配列（例えば、AAGG など）を含むものである。例えば宿主がエシェリキア属菌の場合、好適には

Trp プロモーター、lac プロモーター、recA プロモーター、 λ PL プロモーター、lpp プロモーター、tac プロモーターなどを含むものが例示される。酵母中で本発明のポリペプチドを発現させるためのプロモーターとしては、PH05 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーターが挙げられ、宿主がバチルス属菌の場合は、SL01 プロモーター、SP02 プロモーター、penP プロモーターなどが挙げられる。また、宿主が哺乳動物細胞等の真核細胞である場合、SV40 由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。

ターミネーター領域、複製可能単位、エンハンサー配列、ポリアデニレーション部位およびスプライシング接合部位については、自体公知のものをを用いることができる。

選択マーカーとしては、自体公知のものをを用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシン等の抗生物質耐性遺伝子等が例示される。

遺伝子増幅遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、グルタミン酸合成酵素遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子、オルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子、ヒグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子、アスパルラートトランスカルバミラーゼ遺伝子等を例示することができる。

本発明の組換えベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、本発明のポリペプチドをコードする DNA、終止コドンおよびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化や T4 DNA リガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当な DNA フラグメント（例えば、リンカー、他の制限酵素切断部位など）を用いることができる。

本発明の形質転換体は、上述の組換えベクターを宿主細胞に導入することにより調製することができる。

形質転換体の作製に用いられる宿主細胞としては、前記の発現ベクターに適合し、形質転換されうるものであれば特に限定されず、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞あるいは人工的に樹立された組換細胞など種々の細胞

(例えば、細菌 (エシェリキア属菌、バチルス属菌)、酵母 (サッカロマイセス属、
5 ピキア属など)、動物細胞または昆虫細胞 (好ましくは、Sf9) などが例示される。

発現ベクターの宿主細胞への導入は自体公知の方法を用いて行うことができる。
例えば、動物細胞の場合は、例えばGrahamの方法 (Virology, Vol. 52, p. 456, 1973)、
昆虫細胞の場合は、例えばSummersらの方法 (Mol. Cell. Biol., Vol. 3,
p. 2156-2165, 1983) によってそれぞれ形質転換することができる。

10 本発明のポリペプチドは、上記の如く調製される発現ベクターを含む形質転換体を栄養培地で培養することによって製造することができる。

栄養培地は、形質転換体の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、
15 例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素 (例えば、無機塩 (例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム)、ビタミン類、抗生物質 (例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等) など) を含んでもよい。

20 形質転換体の培養は自体公知の方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地の pH および培養時間は、本発明のポリペプチドが大量に生産されるように適宜選択される。

なお、下記に宿主細胞に応じて用いられる具体的な培地および培養条件を例示するが、何らこれらに限定されるものではない。

25 宿主が動物細胞の場合、培地として例えば約 5 ~ 20% の胎児牛血清を含む MEM 培地 (Science, Vol. 122, p. 501, 1952)、DMEM 培地 (Virology, Vol. 8, p. 396, 1959)、RPMI1640 培地 (J. Am. Med. Assoc., Vol. 199, p. 519, 1967)、199 培地

(proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol. 73, p. 1, 1950) 等を用いることができる。
培地の pH は約 6～8 であるのが好ましく、培養は通常約 30～40℃で約 15～72 時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

宿主が昆虫細胞の場合、例えば胎児牛血清を含む Grace's 培地 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, p. 8404, 1985) 等が挙げられ、その pH は約 5～8 であるのが好ましい。培養は通常約 20～40℃で 15～100 時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

宿主が細菌、放線菌、酵母、糸状菌である場合、例えば上記栄養源を含有する液体培地が適当である。好ましくは、pH が 5～8 である培地である。

10 宿主が *E. coli* の場合、好ましい培地として LB 培地、M9 培地 (Miller ら、Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 431, 1972) 等が例示される。かかる場合、培養は、必要により通気、攪拌しながら、通常 14～43℃、約 3～24 時間行うことができる。

15 宿主が *Bacillus* 属菌の場合、必要により通気、攪拌をしながら、通常 30～40℃、約 16～96 時間行うことができる。

宿主が酵母である場合、培地として、例えば Burkholder 最小培地 (Bostian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, p. 4505, 1980) が挙げられ、pH は 5～8 であることが望ましい。培養は通常約 20～35℃で約 14～144 時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

20 本発明のポリペプチドは、上述のような形質転換体を培養し、該形質転換体から回収、好ましくは単離、精製することができる。

単離、精製方法としては、例えば塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動など分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点

の差を利用する方法などが挙げられる。

また、タグ（例えば、ヒスチジンタグ、F l a g タグ）などを付加したポリペプチドを形質転換体に産生させ、当該タグに親和性を有する物質（例えば、N i²⁺レジン、タグに特異的な抗体）を用いることにより、より簡便に、本発明のポリペプチドを単離、精製することもできる。

さらに、本発明のポリペプチドは、無細胞系にて合成可能である。無細胞系による本発明のポリペプチドの合成では、例えば、大腸菌、ウサギ網状赤血球、コムギ胚芽からの抽出液などを使用できる。また、本発明のポリペプチドは、固相合成法、液相合成法等の自体公知の有機化学的方法によって作製できる。

10 2. 2. 切断方法

また、本発明のポリペプチドは、DANCEをDANCE特異的プロテアーゼに接触させ、DANCEを切断することにより得ることができる。本発明はさらに、このような切断方法を提供する。

本方法におけるDANCEのDANCE特異的プロテアーゼへの接触は、配列番号2で表されるアミノ酸配列において77番目のアミノ酸と78番目のアミノ酸との間が切断される限り如何なる様式でもよいが、かかる切断を達成する接触の態様としては、例えば、DANCE及びDANCE特異的プロテアーゼの両方を発現する細胞の培養が挙げられる。かかる細胞の培養は、上述した形質転換体の培養に準じて行うことができる。

DANCE及びDANCE特異的プロテアーゼの両方を発現する細胞は、この2つのタンパク質を発現する限り特に限定されない。このような細胞は、例えば、DANCE発現細胞（例えば、DANCEを天然で発現する細胞、又は遺伝子操作によりDANCEの発現が可能となった細胞）へのDANCE特異的プロテアーゼ発現ベクターの導入、DANCE特異的プロテアーゼ発現細胞へのDANCE発現ベクターの導入、任意の細胞へのDANCE発現ベクター及びDANCE特異的プロテアーゼ発現ベクターの導入などにより作製できる。

また、発現を増強させる目的で、DANCE及び／又はDANCE特異的プロ

テアーゼの発現細胞に、それぞれ、DANCE及び／又はDANCE特異的プロテアーゼの発現ベクターを導入してもよい。

DANCE発現細胞は、初代培養細胞、細胞株のいずれでもよい。DANCEの主要な発現部位としては、特に限定されるものではないが、例えば、心臓、腎臓、膵臓、精巣、卵巣、小腸、結腸、動脈、肺、子宮、皮膚が知られているので、
5 これら発現部位に相当する組織由来の細胞自体、又はそれから誘導される細胞を、DANCE発現細胞として用いることができる。初代培養細胞、細胞株は、自体公知の方法により作製できる（例えば、Current Protocols in Cell Biology, John Wiley & Sons, Inc. (2001); 機能細胞の分離と培養, 丸善書店(1987)参照)。

10 DANCE特異的プロテアーゼ発現細胞についても、初代培養細胞、細胞株のいずれでもよい。例えば、皮膚線維芽細胞、293T細胞などの細胞、並びに肺、皮膚などの組織においてDANCE特異的プロテアーゼの発現が確認されているので、これらの細胞自体、又はこれらの組織由来の細胞、あるいはそれらから誘導される細胞を、DANCE特異的プロテアーゼ発現細胞として用いることがで
15 きる。また、ある細胞がDANCEの切断活性を有するか否か評価した結果、DANCEの切断活性を有することが明らかになった細胞についても同様に、DANCE特異的プロテアーゼ発現細胞として用いることができる。本発明はまた、動物細胞（例えば、ヒト細胞等の哺乳動物細胞）を用いる、このようなDANCE特異的プロテアーゼ発現細胞の同定方法を提供する。

20 本切断方法で用いられる細胞種としては、上述した形質転換体の作製に用いられる宿主と同種の細胞を用いることができるが、なかでも、昆虫細胞、動物細胞（例えば、哺乳動物細胞）が好ましい。

DANCE発現ベクターは、本発明のポリペプチドを発現するベクターと同様の方法により作製できる。

25 DANCE特異的プロテアーゼ発現ベクターは、後述するDANCE特異的プロテアーゼのスクリーニング方法に記載される方法により作製できる。なお、DANCE特異的プロテアーゼ発現ベクターは、後述の発現スクリーニングにおけ

る、DANCE特異的発現ベクターが濃縮された形質転換体から得られる、DANCE特異的プロテアーゼ以外の遺伝子産物発現ベクターとの混合物であってもよい。

- 5 本切断方法における接触の別の態様としては、DANCE特異的プロテアーゼ含有画分へのDANCEの添加が挙げられる。DANCE特異的プロテアーゼ含有画分は、DANCEの切断活性を有する限り特に限定されず、例えば、DANCE特異的プロテアーゼ発現細胞の培養上清、当該細胞の抽出液、DANCE特異的プロテアーゼを発現する組織の抽出液、当該培養上清や抽出液からの粗精製液などが挙げられる。また、DANCE特異的プロテアーゼが単離精製された場合
- 10 には、DANCE含有画分又は単離されたDANCEと単離されたDANCE特異的プロテアーゼとの混合により、DANCEの切断が可能となる。

DANCE特異的プロテアーゼによるDANCEの切断は、抗DANCE抗体を用いた免疫学的手法（例えば、免疫沈降法、ウェスタンブロッティング）などにより確認できる。

- 15 本切断方法は、本発明のポリペプチドの作製のみならず、本発明のスクリーニング方法における指標としても有用である。

3. DANCEの切断により生じるN末端側及びC末端側ポリペプチドに対する抗体

- 20 本発明はまた、DANCE特異的プロテアーゼによるDANCEの切断により生じる、N末端側のポリペプチド（即ち、配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又はその均等物）に対する抗体、並びにC末端側のポリペプチド（即ち、配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又はその均等物）に対する抗体を提供する。

- 25 本発明の抗体の作製に用いられる抗原としては、配列番号6又は配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド又はその均等物、あるいはそれらの部分ペプチドを用いることができる。部分ペプチドとしては、抗原性を有する限り特に限定されないが、例えば、配列番号6又は配列番号8で表されるアミノ酸

配列、又は配列番号 6 又は配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列から選ばれる少なくとも 6 個、好ましくは少なくとも 8 個、より好ましくは少なくとも 10 個、さらにより好ましくは少なくとも 15 個以上の連続したアミノ酸からなるペプチドであり得る。

- 5 本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれであってもよく、周知の免疫学的手法により作製することができる。この抗体は、完全な抗体分子だけでなく、本発明のタンパク質に対する抗原結合部位（CDR）を有する限りいかなるフラグメントであってもよく、例えば、Fab、F(ab')₂、ScFv、minibody 等が挙げられる。
- 10 例えば、ポリクローナル抗体は、上記抗原（必要に応じて、ウシ血清アルブミン、KLH（Keyhole Limpet Hemocyanin）等のキャリア蛋白質に架橋した複合体とすることもできる）を、市販のアジュバント（例えば、完全または不完全フロイントアジュバント）とともに、動物の皮下あるいは腹腔内に 2～3 週間おきに 2～4 回程度投与し（部分採血した血清の抗体価を公知の抗原抗体反応により測
- 15 定し、その上昇を確認しておく）、最終免疫から約 3～10 日後に全血を採取して抗血清を精製することにより取得できる。抗原を投与する動物としては、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ハムスターなどの哺乳動物が挙げられる。
- 20 また、モノクローナル抗体は、細胞融合法により作成することができる。例えば、マウスに上記抗原を市販のアジュバントと共に 2～4 回皮下あるいは腹腔内に投与し、最終投与の 3 日後に脾臓あるいはリンパ節を採取し、白血球を採取する。この白血球と骨髓腫細胞（例えば、NS-1、P3X63Ag8 など）を細胞融合して該因子に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る。細胞融合は PEG 法でも電圧パルス法であってもよい。所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、周知の EIA または RIA 法等を用いて抗原と特異的に結
- 25 合する抗体を、培養上清中から検出することにより選択できる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養は、インビトロ、またはマウスもしくはラット、好ましくはマウス腹水中等のインビボで行うことができ、抗体はそれぞれ

ハイブリドーマの培養上清および動物の腹水から取得することができる。

さらに、本発明の抗体は、キメラ抗体、ヒト化、ヒト型、キメラ抗体であつてもよい。キメラ抗体は、例えば「実験医学（臨時増刊号），Vol. 6, No. 10, 1988」、特公平 3-73280 号公報等を、ヒト化抗体は、例えば特表平 4-506458 号公報、特開
5 昭 62-296890 号公報等を、ヒト抗体は、例えば「Nature Genetics, Vol. 15, p. 146-156, 1997」、「Nature Genetics, Vol. 7, p. 13-21, 1994」、特表平 4-504365 号公報、国際出願公開 W094/25585 号公報、「日経サイエンス、6 月号、第 40～第 50 頁、1995 年」、「Nature, Vol. 368, p. 856-859, 1994」、特表平 6-500233 号公報等を参考にそれぞれ作製することができる。

- 10 本発明の抗体は、本発明のポリペプチドの一方を特異的に検出又は阻害できるため、例えば、本発明のスクリーニング方法を行うため、並びに弾性線維形成調節剤及び DANCE に関する研究・診断用試薬として有用である。

4. DANCE 切断量及び切断活性の測定方法、キット

- 15 本発明は、DANCE 特異的プロテアーゼによる DANCE 切断量及び／又は切断活性を測定することを特徴とする方法、なかでも、動物由来の生体試料において、DANCE 特異的プロテアーゼによる DANCE 切断量を測定することを特徴とする方法、ならびに当該測定を可能とするキットを提供する。

- 20 本方法において、動物由来の生体試料が用いられる場合、使用される動物は、温血動物である限り特に限定されないが、例えば、哺乳動物であり得る。哺乳動物は特に限定されるものではないが、例えばヒト、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、サル、ウサギ、ラット、ハムスター、モルモット、及びマウスが挙げられる。

生体試料は、上記動物から採取可能なものである限り特に限定されない。生体試料としては、例えば、皮膚、動脈、肺、子宮等の組織から採取したものが挙げられる。

- 25 DANCE 切断量は、自体公知の方法により測定できる。例えば、DANCE 切断量は、抗 DANCE 抗体を用いる免疫学的手法（例えば、ウェスタンブロッティング）により測定できる。この場合、上述した本発明の抗体に限らず、任意

の抗DANCE抗体（例えば、DANCEの切断部位にまたがる部分ペプチドを抗原として用いて作製した抗体）を使用できる。かかる抗体は、上述した抗体の作製方法に準じて作製できる。

5 DANCE切断量の測定に抗DANCE抗体を用いる場合、例えば、標識された抗DANCE抗体の使用、あるいは抗DANCE抗体と標識された2次抗体の併用により、DANCE切断量が測定できる。

抗DANCE抗体の標識としては、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、パーオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ等の酵素、蛍光物質などが挙げられる。これらの標識と抗DANCE抗体との結合は自体公知の方法、例え
10 ば、グルタルアルデヒド法、マレイミド法などにより行なうことができる。

標識が酵素である場合、基質としては、選択した酵素に応じて適当なものが選ばれる。例えば、酵素としてアルカリホスファターゼを選択した場合においてはp-ニトロフェニルホスフェート（PNPP）等が挙げられ、この際の発色剤としてo-フェニレンジアミン（OPD）、テトラメチルベンチジン（TMB）など
15 が使用される。また、洗浄液、反応停止液、基質溶解液についても、選択した酵素に応じて、従来公知のものを特に制限なく適宜使用することができる。

また、DANCE切断活性は、例えば、DANCE切断部位を有するポリペプチドの一端に蛍光分子、もう一端にクエンチャーを結合しておき、切断が生じた際にのみ蛍光を発するシステムを構築、使用することにより、測定できる。この
20 ようなシステムの構築は、自体公知の方法により行うことができる。

DANCE切断活性の測定に用いられる蛍光分子としては、DANCE切断活性を評価し得る限り特に限定されるものではないが、例えば、FITC、6-FAM、HEX、TET、EDANS、Alexa（登録商標）Fluor
(Invitrogen) などが挙げられる。

25 DANCE切断活性の測定に用いられるクエンチャーとしては、DANCE切断活性を評価し得る限り特に限定されるものではないが、例えば、TAMRA、Dabcyl、Eclipse、QSYクエンチャー色素(Invitrogen)などが挙

げられる。

本発明の測定方法は、例えば、本発明のスクリーニング方法を行うため、並びに弾性線維形成の状態についての診断、特に分子レベルでの解析を可能とするため有用である。

- 5 また、本発明は、DANCE切断量及び／又は切断活性の測定を可能とするキットに関する。

DANCE切断量の測定を可能にする本発明のキットは、上述した抗DANCE抗体に加え、DANCE、2次抗体、標識酵素に対する基質、生体試料の処理に必要な試薬などを含むことができる。このキットはまた、DANCEの切断により生じるポリペプチド（即ち、本発明のポリペプチド）の一方、両方をコントロールとして含むことができる。このキットはさらに、DANCE切断量が弾性線維形成の指標となり得る旨を記載している説明書を含んでいてもよい。

10

DANCE切断活性の測定を可能にする本発明のキットは、DANCE、蛍光分子、クエンチャーなどを含むことができる。このキットはまた、上述したDANCE変異体をコントロールとして含むことができる。このキットはさらに、DANCE切断活性が弾性線維形成の指標となり得る旨を記載している説明書を含んでいてもよい。

15

本発明の測定用キットは、DANCE切断量及び／又は切断活性を簡便に測定し得る手段を提供するため有用である。

20 5. DANCE変異体、それをコードするポリヌクレオチド

また、本発明は、DANCE特異的プロテアーゼによるDANCEの切断部位に、当該プロテアーゼに抵抗性を示すようにアミノ酸変異が導入されているDANCE変異体、又は当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。

本発明のDANCE変異体は、配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列において、あるいは配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列において、DANCE特異的プロテアーゼに抵抗性を示すようにプロテアーゼ切断部位（A r g - G l y：配列番号2で表されるアミ

25

ノ酸配列において77番目～78番目のアミノ酸、および配列番号4で表されるアミノ酸配列において54番目～55番目のアミノ酸に相当)又はその近傍のアミノ酸(例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列において70番目～85番目、好ましくは72番目～83番目、より好ましくは74番目～81番目、さらに好ましくは76番目～79番目のアミノ酸、あるいは配列番号4で表されるアミノ酸配列において47番目～62番目、好ましくは49番目～60番目、より好ましくは51番目～59番目、さらに好ましくは53番目～56番目のアミノ酸)が変異(例えば、欠失、付加、置換)していることを特徴とする。ここで、「実質的に同一」は、上述したものと同義である。

- 10 「DANCE特異的プロテアーゼに抵抗性を示す」とは、DANCE特異的プロテアーゼによるDANCEの切断能が、変異後においてより低下(例えば75%以下、好ましくは50%以下の低下)することを意味し、切断能の低下の程度は特に限定されない。DANCE変異体がDANCE特異的プロテアーゼに対して抵抗性を示すか否かは、上述した切断方法による正常DANCE、DANCE変異体の切断処理後、正常DANCE、DANCE変異体の切断量を測定・比較することを確認できる。

- 20 本発明のDANCE変異体としては、例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列において、又は配列番号2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列において、77番目のアルギニンがアラニンに置換されたアミノ酸配列からなるポリペプチド、並びに、配列番号4で表されるアミノ酸配列において、又は配列番号4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列において、54番目のアルギニンがアラニンに置換されたアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。

- 25 本発明はまた、本発明のDANCE変異体を含む組換えベクター、当該ベクターを含む形質転換体を提供する。

本発明のDANCE変異体及び当該変異体をコードするポリヌクレオチドは、例えば、本発明のスクリーニング方法におけるネガティブコントロールとして、

並びに弾性線維形成調節剤（例えば、弾性線維の形成のため）及び研究用試薬として有用である。

6. DANCE複合体

6. 1. 少なくとも2つのDANCEを含んでなるDANCE複合体（複合体I）

- 5 本発明は、少なくとも2つのDANCEを含んでなるDANCE複合体（複合体I）を提供する。

本複合体Iは、リシルオキシダーゼ及び／又はLTBP2をさらに含んでいてもよい。リシルオキシダーゼ及び／又はLTBP2は、後述の通り調製できる。

- 10 本複合体Iはまた、インテグリン及び／又はリシルオキシダーゼ様-1をさらに含んでいてもよい。本発明において使用できるインテグリンとしては種々のインテグリンが挙げられるが、なかでも $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_{11b}\beta_3$ 、全ての $\alpha_v\beta$ 、 $\alpha_9\beta_1$ が好ましい。これらインテグリン及びリシルオキシダーゼ様-1、及びその発現部位は公知であり、遺伝子のクローニング、発現細胞の調製は、自体公知の方法により行うことができる。

- 15 好ましくは、本複合体Iは、識別可能な形態である少なくとも2種類のDANCEを含んでなる。ここで、「識別可能な形態」とは、少なくとも2つのDANCEに差異が存在し、当該差異が検出可能であることを意味する。DANCEの識別可能な形態の組合せとしては、標識DANCEと非標識DANCEとの組合せ、2つの異なる標識DANCEの組合せが例示される。

- 20 DANCEの標識は、標識体を非標識体又は異種標識体と識別可能である限り特に限定されないが、例えば、エピトープによる標識、放射性同位体（例えば、 ^{35}S ）による標識が挙げられる。

- 25 DANCEの標識に用いられるエピトープとしては、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、マルトース結合タンパク質（MBP）、インフルエンザヘマグルチニン（HA）、チオレドキシン（Trx）、ヒスチジン（His）タグ、FLAGタグ、Mycタグなどが挙げられる。

本発明の複合体Iが、さらにリシルオキシダーゼ、LTBP2、インテグリン、

リシルオキシダーゼ様－1から選ばれる1以上を含んでなる場合、それらは標識されていても標識されていなくともよい。

エピトープ標識DANCEは、自体公知の方法により作製できる。例えば、エ
ピトープをコードしているヌクレオチドにDANCEをコードするポリヌクレオ
チドを適切に連結して、DNA構築物を作製し、このDNA構築物を宿主細胞で
5 発現させることによりエピトープ標識DANCEを調製できる。一方、放射性同
位体（例えば、³⁵S）標識DANCEは、DANCE発現細胞を放射性同位体含
有培地で培養することで調製できる。

本発明はまた、上述の複合体Iの調製方法を提供する。複合体Iの調製方法は、
10 少なくとも2つのDANCEを接触させ、複合体を形成させることを特徴とする。

また、複合体Iの調製の際、リシルオキシダーゼ及び／又はLTBP2をさら
に接触させてもよい。さらに、インテグリン及び／又はリシルオキシダーゼ様－
1を接触させることもできる。

複合体Iの形成は、DANCEの調製により（即ち、DANCEの調製に伴う
15 必然的な会合）、あるいは別々に調製した少なくとも2種のDANCE（標識DA
NCE－非標識DANCE、2つの異なる標識DANCE）の接触により達成で
きる。

より具体的には、複合体Iの形成は、単離されたDANCEに対する単離され
たDANCE（例えば、識別可能な形態）の接触、及びDANCE発現細胞に対
20 するDANCE発現ベクターの導入（インビトロ、インビボを含む）などにより
達成できる。

複合体I、特に、識別可能な形態である少なくとも2種類のDANCEを含ん
でなる複合体、及び当該複合体の調製方法は、DANCE複合体の形成を調節し
得る物質のスクリーニング方法における指標として、並びに弾性線維形成調節剤
25 及びDANCEに関する研究用試薬として有用である。

6. 2. 少なくとも1つのDANCE及びリシルオキシダーゼを含んでなるDA
NCE複合体（複合体II）

本発明は、少なくとも1つのDANCE及びリシルオキシダーゼを含んでなるDANCE複合体（複合体I I）を提供する。

本複合体I Iは、DANCE（例えば、識別可能な形態のDANCE）及び／又はLTBP2をさらに含んでいてもよい。本複合体I Iはまた、インテグリン及び／又はリシルオキシダーゼ様-1をさらに含んでいてもよい。なお、LTBP2、インテグリン、リシルオキシダーゼ様-1は、それぞれ、上述したように標識されていても標識されていなくともよい。

本発明はまた、上述の複合体I Iの調製方法を提供する。複合体I Iの調製方法は、少なくとも1つのDANCEをリシルオキシダーゼに接触させ、複合体を形成させることを特徴とする。

また、複合体I Iの調製の際、DANCE（例えば、識別可能な形態のDANCE）及び／又はLTBP2をさらに接触させてもよい。さらに、インテグリン及び／又はリシルオキシダーゼ様-1を接触させることもできる。

複合体I Iの形成は、例えば、未標識DANCEと未標識リシルオキシダーゼの接触、未標識DANCEと標識リシルオキシダーゼの接触、標識DANCEと未標識リシルオキシダーゼの接触、同種の標識をそれぞれ有するDANCEとリシルオキシダーゼの接触、あるいは異なる標識をそれぞれ有するDANCEとリシルオキシダーゼの接触により達成できる。

より具体的には、複合体I Iの形成は、単離されたDANCEと単離されたリシルオキシダーゼの接触、並びにDANCE発現細胞に対するリシルオキシダーゼ発現ベクターの導入、及びリシルオキシダーゼ発現細胞に対するDANCE発現ベクターの導入（インビトロ、インビボを含む）などにより達成できる。

リシルオキシダーゼ、及びその発現部位は公知である。従って、リシルオキシダーゼ発現ベクター、及びリシルオキシダーゼ発現細胞（例えば、初代培養細胞、細胞株）は、自体公知の方法により作製できる。例えば、リシルオキシダーゼは、血管平滑筋、皮膚、線維芽細胞などの細胞、並びに動脈、皮膚、肺、子宮などの組織において発現が確認されているので、これら細胞、組織よりリシルオキシ

ダーゼ遺伝子がクローニングでき、また、リシルオキシダーゼ発現細胞が調製できる。

複合体 I I、及び当該複合体の調製方法は、DANCE複合体の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法における指標として、並びに弾性線維形成調節剤及びDANCEに関する研究用試薬として有用である。

6. 3. 少なくとも1つのDANCE及びLTBP2を含んでなるDANCE複合体（複合体 I I I）

本発明は、少なくとも1つのDANCE及びLTBP2を含んでなるDANCE複合体（複合体 I I I）を提供する。

10 本複合体 I I Iは、DANCE（例えば、識別可能な形態のDANCE）及び／又はリシルオキシダーゼをさらに含んでもよい。本複合体 I I Iはまた、インテグリン及び／又はリシルオキシダーゼ様-1をさらに含んでもよい。なお、リシルオキシダーゼ、インテグリン、リシルオキシダーゼ様-1は、それぞれ、上述したように標識されていても標識されていなくともよい。

15 本発明はまた、上述の複合体 I I Iの調製方法を提供する。複合体 I I Iの調製方法は、少なくとも1つのDANCEをLTBP2に接触させ、複合体を形成させることを特徴とする。

また、複合体 I I Iの調製の際、DANCE（例えば、識別可能な形態のDANCE）及び／又はリシルオキシダーゼをさらに接触させてもよい。さらに、インテグリン及び／又はリシルオキシダーゼ様-1を接触させることもできる。

20 複合体 I I Iの形成は、例えば、未標識DANCEと未標識LTBP2の接触、未標識DANCEと標識LTBP2の接触、標識DANCEと未標識LTBP2の接触、同種の標識をそれぞれ有するDANCEとLTBP2の接触、あるいは異なる標識をそれぞれ有するDANCEとLTBP2の接触により達成できる。

25 より具体的には、複合体 I I Iの形成は、単離されたDANCEと単離されたLTBP2の接触、並びにDANCE発現細胞に対するLTBP2発現ベクターの導入、及びLTBP2発現細胞に対するDANCE発現ベクターの導入（イン

ビトロ、インビボを含む) などにより達成できる。

LTBP2、及びその発現部位は公知である。従って、LTBP2発現ベクター、及びLTBP2発現細胞（例えば、初代培養細胞、細胞株）は、自体公知の方法により作製できる。例えば、LTBP2は、血管平滑筋細胞、皮膚線維芽細胞などの細胞、並びに動脈、皮膚、肺、子宮などの組織において発現が確認されているので、これら細胞、組織よりLTBP2遺伝子がクローニングでき、また、LTBP2発現細胞が調製できる。

複合体III、及び当該複合体の調製方法は、DANCE複合体の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法における指標として、並びに弾性線維形成調節剤及びDANCEに関する研究用試薬として有用である。

7. スクリーニング方法

本発明は、種々のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法は、DANCE特異的プロテアーゼの活性を調節し得る物質のスクリーニング方法（スクリーニング方法I、II）、DANCE複合体の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法（スクリーニング方法III～V）、DANCE特異的プロテアーゼのスクリーニング方法（スクリーニング方法VI）に大別される。以下、それぞれのスクリーニング方法について詳述する。

7. 1. DANCE特異的プロテアーゼの活性を調節し得る物質のスクリーニング方法（インビトロ）（スクリーニング方法I）

スクリーニング方法Iは、動物を用いずにDANCE特異的プロテアーゼの活性を評価できる限り特に限定されないが、例えば、以下の工程（a）、（b）及び（c）を含む：

（a）被検物質を、DANCE特異的プロテアーゼに接触させる工程；

（b）上記（a）の工程に起因して生じるDANCE特異的プロテアーゼの活性を測定し、該活性を被検物質を接触させない場合のDANCE特異的プロテアーゼの活性と比較する工程；

（c）上記（b）の比較結果に基づいて、DANCE特異的プロテアーゼの活性

の調節をもたらす被検物質を選択する工程。

なお、DANCE特異的プロテアーゼの活性を調節し得る物質は、いわゆるDANCE特異的プロテアーゼのアゴニスト、アンタゴニストのみならず、本スクリーニング方法Iの性質上、DANCE特異的プロテアーゼの発現量を変動させ得る物質をも含む。

5 工程(a)において、被検物質としては、いかなる公知化合物及び新規化合物であってもよく、例えば、核酸、糖質、脂質、蛋白質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライ
10ブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

被検物質のDANCE特異的プロテアーゼへの接触は、「2. 2. 切断方法」で言及した接触と同様である。

15 工程(b)において、DANCE特異的プロテアーゼの活性は、DANCE切断量及び／又は切断活性に基づいて評価できる。例えば、DANCE切断量及び切断活性は、「4. DANCE切断量及び切断活性の測定方法、キット」で言及した方法により測定できる。

DANCE切断量及び／又は切断活性の比較は、被検物質の存在下、不在下において、DANCE切断量及び／又は切断活性における有意差の有無に基づいて行なわれ得る。なお、被検物質の不在下におけるDANCE切断量及び／又は切断活性は、被検物質の存在下におけるDANCE切断量及び／又は切断活性の測定に対し、事前に測定したものであっても、同時に測定したものであってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定したものが好ましい。

25 次いで、工程(c)において、DANCE特異的プロテアーゼの活性を調節する被検物質が選択される。このように選択された被検物質は、弾性線維形成調節剤又は研究用試薬として有用である。例えば、DANCE特異的プロテアーゼの活性を阻害する物質は、弾性線維形成の維持に有用であり得る。

7. 2. DANCE特異的プロテアーゼの活性を調節し得る物質のスクリーニン

グ方法（インビボ）（スクリーニング方法 I I）

スクリーニング方法 I I は、動物を用いて DANCE 特異的プロテアーゼの活性を評価できる限り特に限定されないが、例えば、以下の工程（a）、（b）及び（c）を含む：

5 （a）被検物質を動物に投与する工程；

（b）上記（a）の工程に起因して生じる DANCE 特異的プロテアーゼの活性を測定し、該活性を被検物質を投与しない場合の DANCE 特異的プロテアーゼの活性と比較する工程；

10 （c）上記（b）の比較結果に基づいて、DANCE 特異的プロテアーゼの活性の調節をもたらす被検物質を選択する工程。

なお、DANCE 特異的プロテアーゼの活性を調節し得る物質は、いわゆる DANCE 特異的プロテアーゼのアゴニスト、アンタゴニストのみならず、本スクリーニング方法 I I の性質上、DANCE 特異的プロテアーゼの発現量を変動させ得る物質をも含む。

15 工程（a）において、被検物質としては、スクリーニング方法 I と同様のものを用いることができる。

被検物質の動物への投与は、自体公知の方法により行なわれる。投与量・頻度、投与期間は、任意に設定できる。なお、本方法が適用される動物は、「4. DANCE 切断量の測定方法、キット」で言及した動物と同様である。

20 工程（b）において、DANCE 特異的プロテアーゼの活性は、例えば、対象動物からの生体試料の採取後、当該生体試料における DANCE 切断量に基づいて評価できる。生体試料、DANCE 切断量の測定方法は、「4. DANCE 切断量及び切断活性の測定方法、キット」で言及したものと同様である。

25 DANCE 切断量の比較は、被検物質の投与時、非投与時において、DANCE 切断量における有意差の有無に基づいて行なわれ得る。なお、被検物質の非投与時における DANCE 切断量は、被検物質の投与時における DANCE 切断量の測定に対し、事前に測定したものであっても、同時に測定したものであっても

よいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定したものが好ましい。

次いで、工程（c）において、DANCE特異的プロテアーゼの活性を調節する被検物質が選択される。このように選択された被検物質は、弾性線維形成調節剤又は研究用試薬として有用である。例えば、DANCE特異的プロテアーゼの活性を阻害する物質は、弾性線維形成の維持に有用であり得る。

7. 3. 少なくとも2つのDANCEを含んでなるDANCE複合体（複合体I）の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法（スクリーニング方法III）

スクリーニング方法IIIは、複合体Iの形成を評価できる限り特に限定されないが、例えば、以下の工程（a）、（b）及び（c）を含む：

- 10 （a）被検物質の存在下、少なくとも2つのDANCEを接触させる工程；
 （b）上記（a）の工程に起因して生じるDANCE複合体の量を測定し、該量を被検物質の不在下におけるDANCE複合体の量と比較する工程；
 （c）上記（b）の比較結果に基づいて、DANCE複合体の形成を調節する被検物質を選択する工程。
- 15 工程（a）において、被検物質としては、スクリーニング方法Iと同様のものを用いることができる。

- 少なくとも2つのDANCEの接触は、「6. 1. 少なくとも2つのDANCEを含んでなるDANCE複合体（複合体I）」で言及した接触と同様である。なお、本スクリーニング方法IIIでは、識別可能な形態のDANCEを用いることが
- 20 好ましい。

工程（b）において、複合体Iの量は、例えば、免疫沈降法（例えば、実施例6参照）とデンストメトリーの併用、表面プラズモン共鳴等の相互作用解析法、ELISAに準じる方法などにより測定できる。

- 複合体Iの量の比較は、被検物質の存在下、不在下において、複合体Iの量における有意差の有無に基づいて行なわれ得る。なお、被検物質の不在下における複合体Iの量は、被検物質の存在下における複合体Iの量の測定に対し、事前に測定したものであっても、同時に測定したものであってもよいが、実験の精度、
- 25

再現性の観点から同時に測定したものが好ましい。

次いで、工程（c）において、複合体 I の形成を調節する被検物質が選択される。このように選択された被検物質は、弾性線維形成調節剤又は研究用試薬として有用である。例えば、複合体 I の形成を促進する物質は、弾性線維形成に有用であり得る。

7. 4. 少なくとも1つのDANCE及びリシルオキシダーゼを含んでなるDANCE複合体（複合体 I I）の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法（スクリーニング方法 I V）

スクリーニング方法 I V は、複合体 I I の形成を評価できる限り特に限定されないが、例えば、以下の工程（a）、（b）及び（c）を含む：

（a）被検物質の存在下、少なくとも1つのDANCEをリシルオキシダーゼに接触させる工程；

（b）上記（a）の工程に起因して生じるDANCE複合体の量を測定し、該量を被検物質の不在下におけるDANCE複合体の量と比較する工程；

（c）上記（b）の比較結果に基づいて、DANCE複合体の形成を調節する被検物質を選択する工程。

工程（a）において、被検物質としては、スクリーニング方法 I と同様のものを用いることができる。

少なくとも1つのDANCEとリシルオキシダーゼの接触は、「6. 2. 少なくとも1つのDANCE及びリシルオキシダーゼを含んでなるDANCE複合体（複合体 I）」で言及した接触と同様である。

工程（b）において、複合体 I I の量は、免疫沈降法（例えば、実施例 7 参照）とデンストメトリーの併用、表面プラズモン共鳴等の相互作用解析法、ELISA に準じる方法などにより測定できる。

複合体 I I の量の比較は、被検物質の存在下、不在下において、複合体 I I の量における有意差の有無に基づいて行なわれ得る。なお、被検物質の不在下における複合体 I I の量は、被検物質の存在下における複合体 I I の量の測定に対し、

事前に測定したものであっても、同時に測定したものであってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定したものが好ましい。

次いで、工程（c）において、複合体 I I の形成を調節する被検物質が選択される。このように選択された被検物質は、弾性線維形成調節剤又は研究用試薬として有用である。

7. 5. 少なくとも1つのDANCE及びLTBP2を含んでなるDANCE複合体（複合体 I I I）の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法（スクリーニング方法V）

スクリーニング方法Vは、複合体 I I I の形成を評価できる限り特に限定されないが、例えば、以下の工程（a）、（b）及び（c）を含む：

（a）被検物質の存在下、少なくとも1つのDANCEをLTBP2に接触させる工程；

（b）上記（a）の工程に起因して生じるDANCE複合体の量を測定し、該量を被検物質の不在下におけるDANCE複合体の量と比較する工程；

（c）上記（b）の比較結果に基づいて、DANCE複合体の形成を調節する被検物質を選択する工程。

工程（a）において、被検物質としては、スクリーニング方法 I と同様のものを用いることができる。

少なくとも1つのDANCEとLTBP2の接触は、「6. 3. 少なくとも1つのDANCE及びLTBP2を含んでなるDANCE複合体（複合体 I I I）」で言及した接触と同様である。

工程（b）において、複合体 I I I の量は、免疫沈降法（例えば、実施例 6 参照）とデンストメトリーの併用、表面プラズモン共鳴等の相互作用解析法、ELISAに準じる方法などにより測定できる。

複合体 I I I の量の比較は、被検物質の存在下、不在下において、複合体 I I I の量における有意差の有無に基づいて行なわれ得る。なお、被検物質の不在下における複合体 I I I の量は、被検物質の存在下における複合体 I I I の量の測

定に対し、事前に測定したものであっても、同時に測定したものであってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定したものが好ましい。

次いで、工程（c）において、複合体 I I I の形成を調節する被検物質が選択される。このように選択された被検物質は、弾性線維形成調節剤又は研究用試薬として有用である。

7. 6. DANCE 特異的プロテアーゼのスクリーニング方法（スクリーニング方法 V I）

スクリーニング方法 V I は、DANCE の切断活性を指標に、DANCE 特異的プロテアーゼをスクリーニングすることを特徴とする。

10 DANCE 特異的プロテアーゼは、例えば、当該プロテアーゼを発現する細胞より得ることができる。DANCE 特異的プロテアーゼ発現細胞は、「2. 2. 切断方法」で言及した細胞と同様である。

例えば、スクリーニング方法 V I として、発現クローニングの方法を用いることができる（例えば、Molecular Cloning（第 2 版）；Current protocols in
15 Molecular Biology（第 3 版），Acad. Press（1993）；Antibody Engineering：A Practical Approach，IRL Press at Oxford University Press（1996）参照）。

具体的には、DANCE 特異的プロテアーゼ発現細胞より cDNA を調製し、該 cDNA を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換え発現ベクターを作製し、cDNA ライブラリーを作製する。組換え発現ベ
20 クターを、該ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、DANCE 特異的プロテアーゼ発現細胞に由来する遺伝子産物を発現する形質転換体を作製し、この形質転換体のなかから DANCE 特異的プロテアーゼを産生する形質転換体を選択する。次いで、DANCE 特異的プロテアーゼを産生する形質転換体に導入した cDNA にコードされている遺伝子配列を決定することにより、DANC
25 E 特異的プロテアーゼを取得することができる。

本スクリーニング方法 V I で用いられる宿主細胞としては、DANCE の切断活性を有していないか、又は DANCE の切断活性が極めて低い細胞であれば如

何なる細胞でも用いることができる。ある細胞がDANCEの切断活性を有するか否かは、当該細胞にDANCE発現ベクターを導入し、発現されたDANCEの切断の有無を確認することにより評価できる。

cDNAの作製に用いられる細胞としては、DANCE特異的プロテアーゼ発
5 現細胞、例えば、皮膚線維芽細胞、293T細胞、動脈平滑筋細胞などの細胞、
並びに肺組織、子宮組織などの組織由来の細胞が用いられる。

cDNAライブラリーの調製は、自体公知の方法により行なわれる。まず、D
ANCE特異的プロテアーゼ発現細胞から、酸性チオシアン酸グアニジン・フェ
ノール・クロロホルム（AGPC）法等の方法により全RNAを調製する。次い
10 で、オリゴ（dT）固定化セルロースカラム法等の方法により、又は市販のキッ
ト（例えば、Quick Prep mRNA Purification Kit（Pharmacia製））を用いて、m
RNAを調製する。次いで、調製したmRNAからcDNAライブラリーを作製
する（例えば、Molecular Cloning（第2版）、Current protocols in Molecular
Biology（第3版）参照）。cDNAライブラリーの作製に用いられる発現ベクタ
15 ーとしては、用いる宿主細胞においてインサートの発現が可能である限り特に限
定されない。

作製したcDNAライブラリーをそのまま用いてもよいが、目的とする遺伝子
を濃縮するために、DANCE特異的プロテアーゼを発現していない細胞のmR
NAを用い、サブトラクション法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5783 (1988)）
20 を行なって作製したcDNAライブラリーを用いることもできる。

また、DANCEを発現していない細胞を宿主細胞として選択した場合には、
上記の通り調製されたcDNAライブラリーに加えて、DANCE発現ベクター
もまた宿主細胞に導入される。組換えベクターの宿主細胞への導入方法としては、
動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、
25 エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法が挙げら
れる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養することにより、導入した

cDNAがコードする遺伝子産物を発現させることができる。形質転換体を培地で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。例えば、培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、 α MEM培地、DMEM培地、199培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。培養は、通常pH6~8、30~40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1~7日間行われる。また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

本スクリーニング方法VIでは、上述した形質転換体の培養後、培養上清においてDANCEの切断の有無又は程度をウエスタンブロッティング等の方法により確認することで、DANCE特異的プロテアーゼを産生する形質転換体を選択することができる。必要に応じて、上述の工程を複数繰り返すことで、DANCE特異的発現ベクターが濃縮された形質転換体を得ることができる。選択した形質転換体に導入したcDNAの単離、および単離したcDNAの遺伝子配列の決定は、自体公知の方法により行うことができる。なお、本発明はまた、このように取得されたDANCE特異的プロテアーゼをコードするポリヌクレオチドについても提供する。

スクリーニング方法VIは、発現クローニングの方法以外でも行うことができる。具体的には、DANCE特異的プロテアーゼ発現細胞の抽出液又は培養上清を調製し、DANCEの切断活性を指標として該抽出液又は培養上清を分画することにより、DANCE特異的プロテアーゼを精製することができる。精製方法としては、例えば、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、陰イオン交換クロマトグラフィー法、陽イオン交換クロマトグラフィー法、疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法、あるいはこれら方法の組合せが挙げられる。

また、ヒト等のゲノム解析が完了した現在では、データベースに登録されている配列、発現部位等の情報、相同性検索等の手段に基づきプロテアーゼをクロー

ニングし、当該プロテアーゼにつきDANCE切断活性を逐一評価することで、DANCE特異的プロテアーゼをスクリーニングすることもできる。なお、DANCE特異的プロテアーゼは、セリンプロテアーゼインヒビターであるアプロチニンにより阻害されるという知見が得られている。従って、本スクリーニング方法では、効率性重視の観点から、セリンプロテアーゼが優先的にスクリーニングされる。

本スクリーニング方法VIは、DANCE特異的プロテアーゼのスクリーニングを可能にするため有用である。また、当該スクリーニング方法により得られるDANCE特異的プロテアーゼは、弾性線維形成調節剤として（例えば、弾性線維の破壊のため）、DANCEの切断において、並びに本発明のスクリーニング方法を行うために有用である。

8. キット

また、本発明は、以下（a）及び（b）を含むキットを提供する：

（a）DANCE、又はDANCEをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド；

（b）以下（i）～（vi）の少なくとも1つの成分；

（i）（a）のDANCEと識別可能な形態のDANCE；

（ii）（a）のDANCEと識別可能な形態のDANCEをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド；

（iii）リシルオキシダーゼ；

（iv）リシルオキシダーゼをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド；

（v）LTBP2；

（vi）LTBP2をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

また、本発明のキットは、弾性線維形成を調節するために、又はスクリーニングを行うために使用すべき、又は使用されうることなどを記載する説明書を含むことができる。

本発明のキットはまた、上記成分に加え、インテグリン、インテグリンをコー

ドする塩基配列を有するポリヌクレオチド、リシルオキシダーゼ様－１、リシルオキシダーゼ様－１をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含んでいてもよい。これらは、自体公知の方法により作製できる。

- 5 本発明のキットはさらに、上記成分に加え、DANCE、リシルオキシダーゼ、LTBP 2、インテグリン、リシルオキシダーゼ様－１に対する抗体を含んでいてもよい。これら抗体は、上述した抗体の作製法に準じて作製できる。

本発明のキットは、上記スクリーニング方法Ⅰ～Ⅵ、及びDANCEに関連する他の研究などを行い得る簡便な手段の提供を可能にするため、並びに、弾性線維形成調節剤として（例えば、弾性線維の形成又は維持のために）有用である。

10 9. 弾性線維形成調節剤

本発明の調節剤は、本発明のポリペプチド、抗体、DANCE変異体、複合体又は当該複合体を構成する複数の成分、DANCE特異的プロテアーゼ、あるいはこれらをコードするポリヌクレオチドなどを含有する。

- 15 本発明の調節剤は、任意の担体、例えば、医薬上許容される担体を配合することにより弾性線維形成の調節が所望される状態の予防、治療又は改善などのために用いることができる。

- 例えば、本発明の調節剤が、弾性線維を形成又は再生させる成分を含む場合、当該調節剤は、弾性線維形成の調節が所望される状態、例えば、肺気腫、血管損傷、皮膚弛緩症、創傷、弾性線維劣化（例えば、加齢又は紫外線により引き起こされるもの）、肌荒れ、動脈硬化、大動脈瘤の予防、治療又は改善のため、あるいは美容の目的のために有用である。
- 20

一方、本発明の調節剤が、弾性線維の形成を抑制する成分を含む場合、当該調節剤は、弾性線維形成の抑制が所望される状態、例えば心筋梗塞の予防、治療又は改善のために有用である。

- 25 医薬上許容される担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニット、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセル

ロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、ナトリウムグリコールスターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、
5 エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリシルリシン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

経口投与に好適な製剤は、水、生理食塩水、オレンジジュースのような希釈液に有効量のリガンドを溶解させた液剤、有効量のリガンドを固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッシェ剤または錠剤、適当な分散媒中に有効量のリガンドを懸濁させた懸濁液剤、有効量のリガンドを溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤等である。

非経口的な投与（例えば、皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与など）に好適な製剤としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これ
20 には抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分および医薬上許容される担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌のビ
25 ヒクルに溶解または懸濁すればよい状態で保存することもできる。

本発明の製剤の投与量は、有効成分の種類・活性、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なるが、通常、成

人1日あたり有効成分量として約0.001～約100mg/kgである。

本明細書中で挙げられた全ての刊行物に記載された内容は、本明細書での引用により、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示を示すものにすぎず、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

実施例

1. 材料及び方法

1. 1. 発現プラスミドの構築

本発明で用いた発現プラスミドは、下記の通り作製した。なお、これらコンストラクトはすべて塩基配列を確認した後、発現実験に用いた。

pEF6/ssFLAG:

pEF6/V5-A プラスミド (Invitrogen) の Kpn I - Pme I 部位に、合成ヌクレオチド

ggtaccgctagcgaattcaccatgtctgcacttctgacctagctcttgttgagctgcagttgctgactac
aaagacgatgacgacaagactagtcacatcaccatcaccattctagagaaggatccgatatccgcggccgc
atcgattgactagctgaggccgcaaaccc (配列番号17) およびその相補鎖合成ヌクレ
オチドを組み込んだ。これにより、Kpn I - Nhe I - EcoRI - プレプロトリプシ
ンシグナルペプチド (MSALLILALVGAAVA (配列番号18)) - FLAG タグ (DYKDDDDK
(配列番号19)) - Spe I - 6 x His タグ (HHHHHH (配列番号20)) - Xba I - BamHI
- EcoRV - Not I - Cla I が伸長因子 (Elongation Factor) プロモーターの下流、
ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列の上流に位置する。

pEF6/ssMyc:

pEF6/ssFLAG プラスミドの EcoRI - Spe I 部位に、合成ヌクレオチド

gaattcaccatgtctgcacttctgacctagctcttgttgagctgcagttgctgactacgaagaggacgaa
caaaaactcatctcagaaggatctgactagt (配列番号21) およびその相補鎖合成ヌ
クレオチドを組み込んだ。これにより、Kpn I - Nhe I - EcoRI - プレプロトリ
プシンシグナルペプチド (MSALLILALVGAAVA (配列番号18)) - Myc タグ

(EQKLISEEDL (配列番号 22)) - Spe I - 6 x His タグ (HHHHHH (配列番号 20)) - Xba I - BamHI - EcoRV - Not I - Cla I が伸長因子プロモーターの下流、ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列の上流に位置する。

pEF6/FLAG:

- 5 pEF6/V5-A プラスミド (Invitrogen) の Kpn I - Pme I 部位に、合成ヌクレオチド
- tggtaccgagctcggatccactagtcagtggtggaattctgcagatatccagcacagtggcgccgctct
agagactacaaagacgatgacgacaagagagggtctcatcatcaccatcaccattgagcgccgcaaacc
- (配列番号 23) およびその相補鎖合成ヌクレオチドを組み込んだ。これにより、
- 10 Kpn I - BamHI - Spe I - EcoRI - EcoRV - Xba I - FLAG タグ (DYKDDDDK (配列番号 19)) - 6 x His タグ (HHHHHH (配列番号 20)) - ストップコドン - Not I が伸長因子プロモーターの下流、ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列の上流に位置する。

pEF6/ssFLAG - hDANCE:

- 15 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるヒト DANCE の 25 番アミノ酸からス
トップコドンまでをプライマー tctagagcacagtgcacgaatggctttg (配列番号 24)
および gcgcccggtcagaatgggtactgcgacacatatatccg (配列番号 25) を用いて PCR
法にて増幅し、pCR4-Blunt Topo (Invitrogen) に製品記載の方法によりクローニ
ングし、配列を確認したあと Xba I - Not I で切り出し、pEF6/ssFLAG の Spe I -
- 20 Not I 部位に組み込んだ。

pEF6/ssMyc-hLTBP2:

- ヒト LTBP2 の 36 番アミノ酸からストップコドンまでを
- tctagacaaagggaccccgtagggagatacgag (配列番号 26) および
- gcggccgcctgggtactccttggcagtgagtgagg (配列番号 27) を用いて PCR 法にて増幅
- 25 し、上記と同様に pEF6/ssMyc の Spe I - Not I 部位に組み込んだ。

pEF6-hDANCE-FLAG:

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるヒト DANCE の 1 番アミノ酸から最

後の448番アミノ酸までをプライマーgaattctttcttctcgccttcgcatctcctcc (配列番号28) と tctagagaatgggtactgcgacacatatatccg (配列番号29) を用いてPCR法にて増幅し、上記と同様にクローニング、シークエンスの後、EcoRI - Xba I で切り出して pEF6/FLAG の EcoRI - Xba I 部位に組み込んだ (図1)。

5 pEF6-hDANCE (R77A)-FLAG:

Quick Change in vitro mutagenesis Kit (Stratagene) を用いてヒト DANCE の77番アミノ酸であるアルギニンをアラニンに置換した。その他は pEF6-hDANCE-FLAG に同じである。

pEF6-hDANCE ΔND-FLAG:

- 10 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるヒト DANCE の1番アミノ酸から26番アミノ酸まで、78番アミノ酸から448アミノ酸までをそれぞれPCR法で増幅し、Nhe I 部位で結合した後、pEF6/FLAG の EcoRI - Xba I 部位に組み込んだ (図1)。

pEF6-hDANCE ΔN-FLAG:

- 15 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるヒト DANCE の1番アミノ酸から26アミノ酸まで、113番アミノ酸から448アミノ酸までをそれぞれPCR法で増幅し、Nhe I 部位で結合した後、pEF6/FLAG の EcoRI - Xba I 部位に組み込んだ (図1)。

pEF6-hDANCE ΔM-FLAG:

- 20 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるヒト DANCE の1番アミノ酸から112番アミノ酸まで、315番アミノ酸から448アミノ酸までをそれぞれPCR法で増幅し、Nhe I 部位で結合した後、pEF6/FLAG の EcoRI - Xba I 部位に組み込んだ (図1)。

pEF6-hDANCE ΔC-FLAG:

- 25 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるヒト DANCE の1番アミノ酸から315番アミノ酸までをPCR法で増幅し、pEF6/FLAG の EcoRI - Xba I 部位に組み込んだ (図1)。

ヒトリシルオキシダーゼ (GenBank アクセッション番号: AF039291.1) cDNA にコードされるポリペプチド (417個のアミノ酸) の22番アミノ酸から417アミノ酸までをPCR法で増幅し、pEF6/ssMyc の XbaI/NotI 部位に組み込んだ。

1. 2. 細胞、トランスフェクション

- 5 発現実験には293T細胞を用いた。トランスフェクションは、LipofectAMINE Plus 試薬を用い、製品記載の方法で行った。トランスフェクション後24時間で無血清培地に交換し、さらに48時間培養した上清または細胞ライセートをウエスタンブロッティング、in vitro バインディングアッセイに用いた。

- 10 マウス新生仔の皮膚線維芽細胞は、“Current Protocols in Cell Biology”に記載の方法で採取、培養した。

ウシ大動脈平滑筋は、Cambrex より購入した。

1. 3: 組換え DANCE

- 15 293T 細胞と pEF6-hDANCE-FLAG を用いてヒト DANCE 安定発現細胞株を作成し、その培養上清からNi-NTAアガロース (Qiagen) を用いて組換えDANCEを精製した後、脱塩カラム (Amersham) を用いて脱塩した。

1. 4. 抗体

- 20 抗マウス DANCE 抗体 BSYN1923 は、マウス DANCE76 - 98 アミノ酸に対応する合成ペプチドをウサギに免疫して作成し、抗原ペプチドを固定したカラムを用いてアフィニティー精製した。抗エラスチンモノクローナル抗体は Chemicon と Elastin Products Company (EPC) から、フィブリリン1ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体、フィブリリン2ポリクローナル抗体、LTBP2 モノクローナル抗体はEPC から購入した。抗 FLAG M2 抗体と抗 FLAG M2 アガロースは Sigma、抗 Myc (9E10) 抗体は Santa Cruz より購入した。ポリクローナル抗エラスチン抗体 (PR533) は Elastin Products Company, INC から購入した。抗ウサギ Alexa Fluor 25 488 抗体、抗マウス Alexa Fluor 546 抗体は Molecular Probes から購入した。

1. 5. 35S-Met, Cys を用いたメタボラベリング (metabolabelling)、免疫沈降、in vitro バインディングアッセイ、ウエスタンブロッティング

"Molecular Cloning, 3rd Ed."に記載の方法で行った。

1. 6. 線維芽細胞培養

ヒト線維芽細胞は京都大学附属病院形成外科より供与して頂いた。24 ウエルプレート
5 レートの底に Cover Glass を置き、その上にヒト線維芽細胞を 1 ウエルあたり 7.5×10^4 個播種し、10%FBS を添加した DMEM 培地にて 37°C 、5% CO_2 で培養した。3 日目に PBS で洗浄後、FBS を添加していない DMEM/F12 培地に換え、精製した DANCE 蛋白質、切断型 DANCE 蛋白質 $4 \mu\text{g/ml}$ 、もしくは FBS を添加した。引き続き 37°C 、5% CO_2 で培養し、14 日目に固定、免疫染色を行った。

1. 7. 免疫染色

10 培養 14 日目に、1ml の PBS にて 3 回洗浄後、100%メタノールにて、 -20°C で 30 分間固定した。PBS にて洗浄後、2%BSA を含む PBS にて、室温で 30 分間ブロッキングした後、ポリクローナル抗エラスチン抗体（希釈率 1/100）、および、モノクローナル抗 FLAG 抗体（希釈率 1/100）と室温で 1 時間以上インキュベートした。PBS で洗浄し、さらに抗ウサギ Alexa Fluor 488 抗体（希釈率 1/100）、抗マウス
15 Alexa Fluor 546 抗体（希釈率 1/100）と室温で 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒドにて、室温で 10 分間固定し、ふたたび PBS で洗浄後、DAPI 含有の Vectashield にてスライドガラス上にサンプルをマウントした。観察は共焦点顕微鏡により行った。

実施例 1 : DANCE の一部は in vitro, in vivo において N 末端が切断されている

20 1. 1. ヒト及びマウス DANCE の 293T 細胞での強制発現

シグナルペプチド切断部位直下に FLAG タグをつけたヒト及びマウス DANCE cDNA を 293T 細胞にトランスフェクションし、無血清培地に交換後 48 時間培養を
続け、その培養上清 $15 \mu\text{l}$ を SDS-PAGE で展開し、ウエスタンブロットを行った。抗体はマウス DANCE の 76-98 番目のアミノ酸に対応するペプチドをウサギに免疫
25 して得られた BSYN、および抗 FLAG M2 抗体を用いた。

その結果、図 2 に示す通り、BSYN はヒト DANCE を認識せず、マウス DANCE は 2 本のバンドとして検出された。これに対して抗 FLAG M2 抗体は、ヒト・マウス DANCE

を1本のバンドとして検出した。

1. 2. マウス由来皮膚線維芽細胞での DANCE の発現

新生仔期の DANCE ノックアウトマウス (Nature 415: 171-175 (2002) 参照) およびその同腹のコントロールマウス皮膚より線維芽細胞を培養し、³⁵S-Met, Cys
5 で24時間ラベルした後、培養上清を BSYN 抗体で免疫沈降した。免疫沈降物は SDS-PAGE で展開し、オートラジオグラフィーで検出した。

その結果、DANCE+/+マウス由来の皮膚線維芽細胞では2本のバンドが検出され、DANCE-/-マウス由来の皮膚線維芽細胞ではバンドが検出されなかった (図3)。

1. 3. マウス肺組織のウエスタンブロット

10 12週齢の DANCE ノックアウトマウスおよびその同腹のコントロールマウスの肺組織抽出物を SDS-PAGE にて展開し、BSYN 抗体でウエスタンブロットを行った。

その結果、DANCE+/+マウスの肺組織では、DANCE が2本のバンドとして検出され、DANCE-/-マウスの肺組織ではバンドが検出されなかった (図4)。

実施例2：切断型 DANCE の N 末端は、DANCE の 78 番目以降のアミノ酸と一致す
15 る

カルボキシル末端に FLAG タグと 6 x His タグのついたヒト DANCE cDNA を 293T 細胞にトランスフェクションし、安定発現株を樹立した。その無血清培養上清 800 ml より Ni-NTA アガロース (Qiagen) を用いて組換え DANCE を精製し、SDS-PAGE で展開して Coomassie-Blue で染色した。主要なバンド2本のうち、切断型 DANCE
20 に相当するバンドを切り出し、エドマン分解により N 末端アミノ酸配列を解析した (図5)。

その結果、切断型 DANCE の N 末端アミノ酸配列は、DANCE の 78 番目以降のアミノ酸配列と一致していた。

以上より、この低分子量タンパク質は、DANCE の 77 番目のアミノ酸と 78 番
25 目のアミノ酸との間での切断により生じると考えられた。

実施例3：DANCE の切断はセリンプロテアーゼインヒビターで阻害される

カルボキシル末端に FLAG タグと 6 x His タグのついたヒト DANCE cDNA を 293T

細胞にトランスフェクションし、システインプロテアーゼインヒビター (E64) またはセリンプロテアーゼインヒビター (アプロチニン) を含む無血清培地で 48 時間培養し、培養上清から Ni-NTA アガロースを用いて沈降させた組換えタンパク質を SDS-PAGE で展開し、抗 FLAG M2 抗体でウェスタンブロットを行った。

- 5 その結果、DANCE の切断は E64 で阻害されなかったが、アプロチニンにより阻害された (図 6)。

以上より、DANCE はセリンプロテアーゼにより切断されることが示唆された。

実施例 4 : DANCE の Arg77 を Ala に置換すると切断されにくくなる

- 10 DANCE の 77 番目のアルギニンをアラニンに置換した変異型 DANCE (C 末端 FLAG, 6 x His タグつき) (図 7) の発現ベクター、及び正常型 DANCE (C 末端 FLAG, 6 x His タグつき) の発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションし、無血清培地で 48 時間培養した培養上清から Ni-NTA アガロースを用いて沈降させた組換えタンパク質を SDS-PAGE で展開し、抗 FLAG M2 抗体でウェスタンブロットを行った。

- 15 その結果、この変異型 DANCE は、プロテアーゼによる切断に対して抵抗性を示すことが明らかとなった (図 8)。

実施例 5 : DANCE はホモ複合体を形成し、また、LTBP2 と結合する

- 20 9cm プレートに播いたウシ大動脈平滑筋細胞を ³⁵S-Met, Cys で 24 時間ラベルした後、培養上清と組換えヒト DANCE (C 末端 FLAG, 6 x His つき) 50 μ g を混ぜて、抗 FLAG アガロース (Sigma) で沈降させたものを SDS-PAGE で展開し、オートラジオグラフィーを行った。同じ培養上清を、弾性線維構成タンパク質 (エラスチン、フィブリリン 1、フィブリリン 2、LTBP2) に対する市販の抗体で免疫沈降し、同じ SDS-PAGE ゲルで展開し、オートラジオグラフィーを行った。

その結果、DANCE がホモ複合体を形成すること、及び DANCE が LTBP2 に結合することが明らかとなった (図 9)。

- 25 実施例 6 : ヒト DANCE と DANCE 又は LTBP2 との結合領域の解析

実施例 5 の結果より、DANCE 同士の結合領域、DANCE の LTBP2 に対する結合領域を解析することとした。

FLAG タグのついたヒト DANCE コンストラクト (図 8)、Myc タグのついたヒト DANCE コンストラクト、及びヒト LTBP2 コンストラクトを別々に 293T 細胞にトランスフェクションした。無血清培地で 48 時間培養後、それぞれの培養上清と細胞抽出液を混ぜ、タンパク質溶液とした。FLAG タグのついた DANCE コンストラクトからのタンパク質溶液と、Myc タグのついた DANCE または LTBP2 からのタンパク質溶液を氷上で 1 時間混ぜ、抗 FLAG 抗体で沈降させたものを SDS-PAGE で展開し、抗 Myc 抗体または抗 FLAG 抗体で検出した。

その結果、DANCE 同士の結合には、N 末端ドメインが、DANCE と LTBP2 との結合には DANCE の中央のドメインが必要であることが明らかとなった (図 10)。また、DANCE と LTBP2 との結合は、DANCE の N 末端又は C 末端ドメインが欠損しているほうが強いことが明らかとなった。

実施例 7 : DANCE はリシルオキシダーゼに結合し得る

リシルオキシダーゼの遺伝子欠損マウスの表現型 (J. Biol. Chem. 278(16): 14387-93 (2003); Circulation 106(19): 2503-9 (2002)) は、本発明者らが以前に報告している DANCE 遺伝子欠損マウスの表現型 (Nature 415: 171-175 (2002)) に非常に類似することを本発明者らは見出した。そこで、本発明者らは DANCE とリシルオキシダーゼとの複合体の形成がその機能の発揮に重要である可能性があると考え、DANCE がリシルオキシダーゼに結合するか否かを評価した。なお、アッセイは、抗 FLAG 抗体で沈降させたものを SDS-PAGE で展開し、抗 Myc 抗体で検出した以外は、実施例 6 と同様に行なった。

その結果、DANCE はリシルオキシダーゼに結合することが示唆された (図 11)。

考察

1. DANCE と LTBP2 の結合

本発明者らは、DANCE が LTBP2 と特異的に結合することを見出した。この結合は、DANCE の中央にあるカルシウム結合性 EGF 様モチーフが連続するドメインを介しておきる。これまでに、本発明者らは DANCE のアミノ末端ドメインが細胞表面インテグリンに結合することを報告し、Liu らは DANCE のカルボキシル末端側

の半分で LOXL1 に結合することを報告した。しかしエラスチンは細胞表面に密着して沈着するのではなく、ミクロフィブリルに沿って沈着していき、成熟した弾性線維になることが知られている (Matrix Biol. 19: 455-6 (2000))。したがって、DANCE と LOXL1 の結合がエラスチンのミクロフィブリルへの沈着・クロスリンクを促進するのであれば、DANCE はミクロフィブリルと結合しているはずである。ミクロフィブリルは長い細胞外線維であり、フィブリリン 1、フィブリリン 2、LTBP2 などの細長いタンパク質分子から成り立っていると考えられている。フィブリリンは 1, 2 どちらのノックアウトマウスも弾性線維の形成異常を来さず、フィブリリンと DANCE の結合も否定的である。LTBP2 は、LTBP ファミリーに属していながら Latent TGF β と結合せず、弾性線維中に局在するタンパク質であるが、その生体内での役割は、LTBP2 ノックアウトマウスが早期胎生致死であることから、よくわかっていない (Mol. Cell Biol. 20: 4879-87 (2000))。今回の本発明者らの発見は、LTBP2 が DANCE をミクロフィブリル上につなぎ止めることによってエラスチンクロスリンク酵素をミクロフィブリルに局在させ、ミクロフィブリルに沿ってエラスチンが沈着・クロスリンクするのを助けていることを示唆する。

2. DANCE 同士の結合

DANCE が単量体ではたらくのか、2 量体もしくは多量体になるかどうかは今までわかっていなかったが、今回、平滑筋培養上清中にある主要な DANCE 結合タンパク質として DANCE が見出された。このことは DANCE がホモ複合体 (2 量体または多量体) を形成することを示している。DANCE 同士の結合はアミノ末端ドメインを介している。以前、本発明者らは、DANCE のアミノ末端ドメインが細胞表面インテグリンに結合することを示したが (J. Biol. Chem. 274(32): 22476-22483 (1999))、今回のデータはアミノ末端ドメインの新たな機能として DANCE 同士の結合促進があることを意味している。

3. DANCE アミノ末端ドメインの切断

本発明者らは、in vivo、in vitro において DANCE の一部はアミノ末端ドメイ

ンが切断されることを見出した。この切断は未同定のセリンプロテアーゼによっておこり、切断部位のアルギニンをアラニンに置換すると切断されにくくなる。DANCE アミノ末端ドメインの機能から推測されるように、切断型 DANCE は、(1) 細胞表面インテグリンと結合しなくなり、(2) DANCE 同士で結合しなくなり、また、(3) 切断型 DANCE は全長 DANCE よりも LTBP2 との結合が強くなる。これら (1) ~ (3) の新知見は、生体内ではプロテアーゼによる DANCE の切断が、DANCE の機能変化、ひいては弾性線維形成の制御機構としてはたらいっていることを示唆する。この考えに基づけば、薬剤による DANCE 切断プロテアーゼの阻害もしくは促進が、弾性線維劣化の予防・再生促進に有用であり得る。

10 4. DANCE とリシルオキシダーゼの結合

LOX1 遺伝子欠損マウスは弾性線維形成異常を来す。LOXL1 は DANCE と直接会合し、DANCE によって弾性線維形成部位につなぎとめられてエラスチンのクロスリンクを行うと考えられる。しかし、LOXL1 遺伝子欠損マウスの表現型は DANCE 遺伝子欠損マウスの表現型と比べると弱く、LOXL1 との結合だけでは DANCE の作用の全てを説明できない。リシルオキシダーゼ遺伝子欠損マウスもやはり弾性線維形成異常を来すが、今回本発明者が見出した DANCE とリシルオキシダーゼの結合は、DANCE がリシルオキシダーゼを繋ぎとめることでエラスチンのクロスリンクが効率よく行われることを示唆する。

実施例 8 : DANCE の切断を調節する物質のスクリーニング

20 カルボキシル末端に FLAG タグと 6 x His タグのついたヒト DANCE cDNA を 293T 細胞にトランスフェクションし、被検物質の存在下、不在下の無血清培地で 48 時間培養し、培養上清から Ni-NTA アガロースを用いて沈降させたヒト DANCE を SDS-PAGE で展開し、抗 FLAG M2 抗体でウエスタンブロットを行う。被検物質の存在下、不在下において、それぞれ 2 本のバンドを定量解析することで、被検物質が DANCE の切断を調節し得るか否かを評価する。

実施例 9 : 種々の年齢のヒト皮膚における全長型及び切断型 DANCE の発現

形成外科手術に伴い切除された皮膚組織における DANCE の発現を調べるため、

抗ヒト DANCE 抗体を用いた Western Blot を行った (図 1 2)。いずれの検体からも全長型および切断型 DANCE タンパクを検出することができたが、年齢及び皮膚採取部位によって発現レベルに大きな差を認めた。まず顔面皮膚において、0 歳児では全長型、切断型 DANCE とともに発現レベルが高く、特に全長型 DANCE 発現レベルが高かったが、成人では全長型、切断型とともに発現レベルが少なく、特に全長型が少ない傾向にあった。光の当たらない他の部位の皮膚では、成人でも全長型、切断型とともに比較的 DANCE 発現レベルが保たれる傾向が見られた。

参考例 1 : 切断型 DANCE にはインテグリンを介した細胞接着促進活性がない

全長型 DANCE は細胞表面インテグリンを介して血管内皮細胞の接着と伸展を促進する。これまでに全長型 DANCE はインテグリン $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ 、 $\alpha 9 \beta 1$ のリガンドとなりうることを本発明者は報告している。リガンドとなるドメインは DANCE アミノ末端ドメインの RGD モチーフ周辺と考えられるため、RGD を RGE に 1 アミノ酸置換した DANCE 変異体 (RGE DANCE)、およびアミノ末端切断型 DANCE (Δ ND DANCE) の各リコンビナントタンパクを精製し、全長型 DANCE とあわせて血管内皮細胞の細胞接着アッセイを行った (図 1 3)。全長型 DANCE の場合、コーティングに用いるタンパク濃度に依存して細胞接着が促進されたが、RGE DANCE にはほとんど細胞接着活性が無く、 Δ ND DANCE には全く細胞接着活性がなかった。

参考例 2 : DANCE のアミノ末端ドメインは弾性線維形成に必要である

次いで、プロテアーゼによる DANCE のアミノ末端ドメイン切断が弾性線維形成に影響するかどうかを検証した。

ヒト皮膚線維芽細胞をコンフルエントになるよう播種し、無血清培地もしくは 10% 牛胎仔血清を含有する培地に替えて 2 週間培養して弾性線維の形成を抗エラスチン抗体による免疫染色で解析した。

その結果、10% の牛胎仔血清を含有する培地では弾性線維の形成がみられた。無血清培地でも細胞は生存していたが、弾性線維はほとんど形成されなかった。しかし無血清培地に組換え DANCE を $4 \mu\text{g/ml}$ になるように加えておくと、血清含有培地と同等以上の弾性線維が形成された。このとき加えた組換え DANCE の局在

を抗 FLAG 抗体で見ると、形成された弾性線維と共局在していた。一方、 Δ ND-DANCE を加えた培地では弾性線維形成が非常に少なく、 Δ ND-DANCE には弾性線維形成活性がほとんどないか、あっても非常に弱いと考えられた。

5 以上より、プロテアーゼによる DANCE アミノ末端ドメインの切断は、DANCE の不活化であると考えられるため、DANCE 切断プロテアーゼの阻害剤は、全長型 DANCE を増やすことによる弾性線維の形成又は維持に有用な薬剤として期待できる。

産業上の利用可能性

10 本発明のスクリーニング方法は、弾性線維形成を調節し得る新規作用機序の医薬の開発、又は DANCE 特異的プロテアーゼの同定を可能にする。また、本発明の測定方法は、弾性線維形成の状態の診断を可能とする。さらに、本発明のポリペプチド、抗体、複合体及びキットは、本発明の方法を行うため、弾性線維形成の調節が所望される状態の予防、治療又は改善のため、あるいは研究・診断用試薬などとして好適である。

15 本出願は、2004年3月29日に日本で出願された特願2004-096685を基礎としており、その内容は本明細書中に援用される。

請求の範囲

1. 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなる、DANCE 特異的プロテアーゼによる DANCE の切断により得られるポリペプチド。
- 5 2. 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。
3. 請求項 1 記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。
4. 配列番号 5 で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド。
5. 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなる、
- 10 DANCE 特異的プロテアーゼによる DANCE の切断により得られるポリペプチド。
6. 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。
7. 請求項 5 記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。
- 15 8. 配列番号 7 で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド。
9. DANCE を DANCE 特異的プロテアーゼに接触させることを特徴とする、DANCE の切断方法。
10. 請求項 1 又は 2 記載のポリペプチドに特異的親和性を有する抗体。
11. 請求項 5 又は 6 記載のポリペプチドに特異的親和性を有するモノクローナル抗体。
- 20 12. 動物由来の生体試料において DANCE の切断量を測定することを特徴とする方法。
13. 抗 DANCE 抗体を含有することを特徴とする、DANCE の切断量の測定用キット。
- 25 14. DANCE 特異的プロテアーゼによる DANCE の切断部位に、当該プロテアーゼに抵抗性を示すようにアミノ酸変異が導入されている、DANCE 変異体。

1 5. 請求項 1 4 記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

1 6. 少なくとも 2 つの DANCE を含んでなる DANCE 複合体。

1 7. 識別可能な形態である少なくとも 2 種類の DANCE を含んでなる、請求
5 項 1 6 記載の複合体。

1 8. リシルオキシダーゼ及び／又は LTBP 2 をさらに含んでなる請求項 1 6
又は 1 7 記載の複合体。

1 9. 少なくとも 1 つの DANCE、並びにリシルオキシダーゼ及び／又は LT
B P 2 を含んでなる DANCE 複合体。

10 2 0. 少なくとも 2 つの DANCE を接触させ、複合体を形成させることを特徴
とする、少なくとも 2 つの DANCE を含んでなる DANCE 複合体の調製方法。

2 1. 少なくとも 1 つの DANCE をリシルオキシダーゼ及び／又は LTBP 2
に接触させ、複合体を形成させることを特徴とする、少なくとも 1 つの DANC
E、並びにリシルオキシダーゼ及び／又は LTBP 2 を含んでなる DANCE 複
15 合体の調製方法。

2 2. 以下の工程 (a)、(b) 及び (c) を含む、DANCE 特異的プロテアー
ゼの活性を調節し得る物質のスクリーニング方法：

(a) 被検物質を、DANCE 特異的プロテアーゼに接触させる工程；

(b) 上記 (a) の工程に起因して生じる DANCE 特異的プロテアーゼの活性
20 を測定し、該活性を被検物質を接触させない場合の DANCE 特異的プロテアー
ゼの活性と比較する工程；

(c) 上記 (b) の比較結果に基づいて、DANCE 特異的プロテアーゼの活性
の調節をもたらす被検物質を選択する工程。

2 3. 弾性線維形成調節剤を同定するための方法である、請求項 2 2 記載の方法。

25 2 4. 以下の工程 (a)、(b) 及び (c) を含む、DANCE 特異的プロテアー
ゼの活性を調節し得る物質のスクリーニング方法：

(a) 被検物質を動物に投与する工程；

(b) 上記 (a) の工程に起因して生じる DANCE 特異的プロテアーゼの活性を測定し、該活性を被検物質を投与しない場合の DANCE 特異的プロテアーゼの活性と比較する工程；

(c) 上記 (b) の比較結果に基づいて、DANCE 特異的プロテアーゼの活性の調節をもたらす被検物質を選択する工程。

25. 以下の工程 (a)、(b) 及び (c) を含む、少なくとも 2 つの DANCE を含んでなる DANCE 複合体の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法：

(a) 被検物質の存在下、少なくとも 2 つの DANCE を接触させる工程；

(b) 上記 (a) の工程に起因して生じる DANCE 複合体の量を測定し、該量を被検物質の不在下における DANCE 複合体の量と比較する工程；

(c) 上記 (b) の比較結果に基づいて、DANCE 複合体の形成を調節する被検物質を選択する工程。

26. 識別可能な形態である少なくとも 2 種類の DANCE を用いる、請求項 25 記載の方法。

27. 以下の工程 (a)、(b) 及び (c) を含む、少なくとも 1 つの DANCE、並びにリシルオキシダーゼ及び／又は LTBP 2 を含んでなる DANCE 複合体の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法：

(a) 被検物質の存在下、少なくとも 1 つの DANCE をリシルオキシダーゼ及び／又は LTBP 2 に接触させる工程；

(b) 上記 (a) の工程に起因して生じる DANCE 複合体の量を測定し、該量を被検物質の不在下における DANCE 複合体の量と比較する工程；

(c) 上記 (b) の比較結果に基づいて、DANCE 複合体の形成を調節する被検物質を選択する工程。

28. 請求項 23～27 のいずれか 1 項記載の方法により得られる弾性線維形成調節剤。

29. DANCE の切断活性を指標とする、DANCE 特異的プロテアーゼのスクリーニング方法。

30. 請求項29記載の方法により得られるDANCE特異的プロテアーゼ。

31. 請求項29記載の方法により得られるDANCE特異的プロテアーゼをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

5 32. 請求項30記載のDANCE特異的プロテアーゼ、又は請求項31記載のポリヌクレオチドを含有する弾性線維形成調節剤。

33. 以下(a)及び(b)を含むキット：

(a) DANCE、又はDANCEをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド；

(b) 以下(i)～(vi)の少なくとも1つの成分；

10 (i) (a)のDANCEと識別可能な形態のDANCE；

(ii) (a)のDANCEと識別可能な形態のDANCEをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド；

(iii) リシルオキシダーゼ；

(iv) リシルオキシダーゼをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド；

15 (v) LTBP2；

(vi) LTBP2をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

34. 以下の工程(a)～(b)を含む、DANCE特異的プロテアーゼ発現細胞の同定方法：

(a) 所定の動物細胞とDANCEとを接触させる工程；

20 (b) DANCEが切断されるか否かを評価する工程。

1/8

図 1

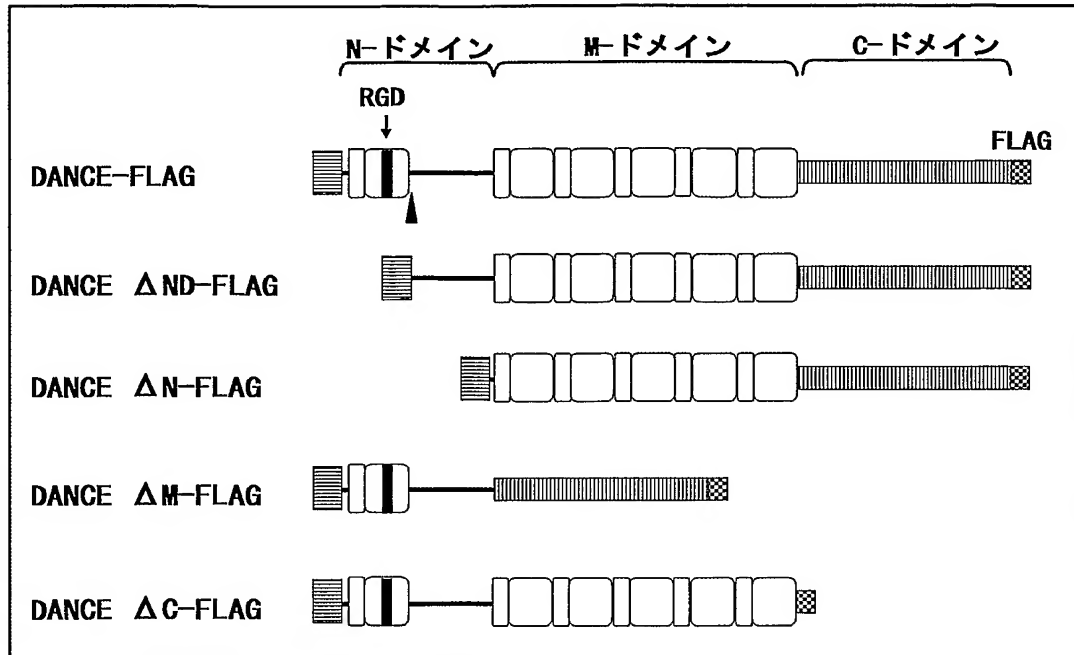
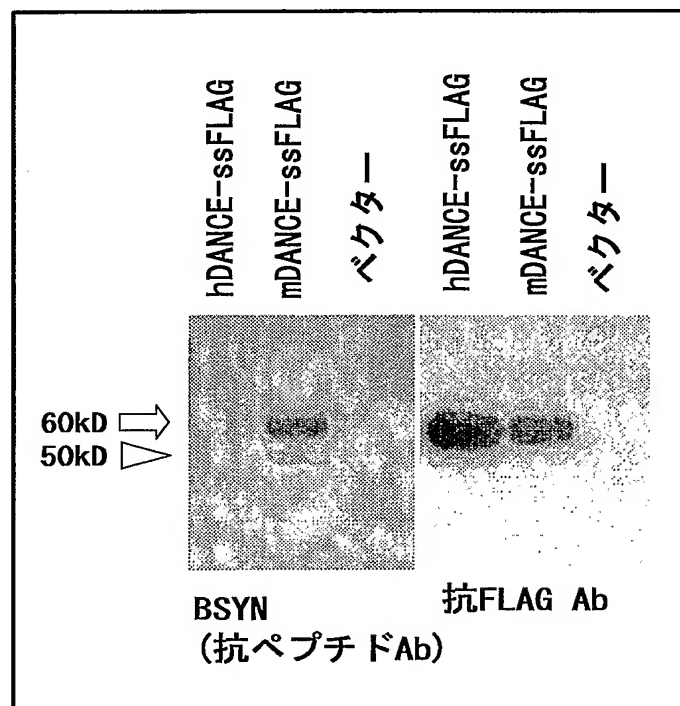


図 2



2/8

図 3

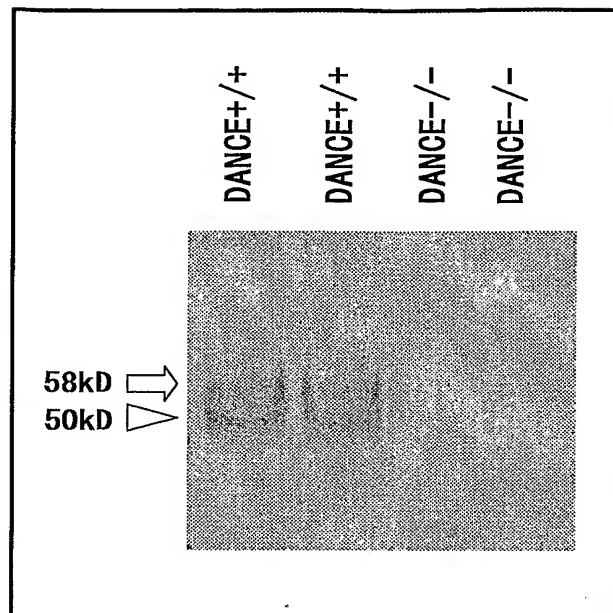
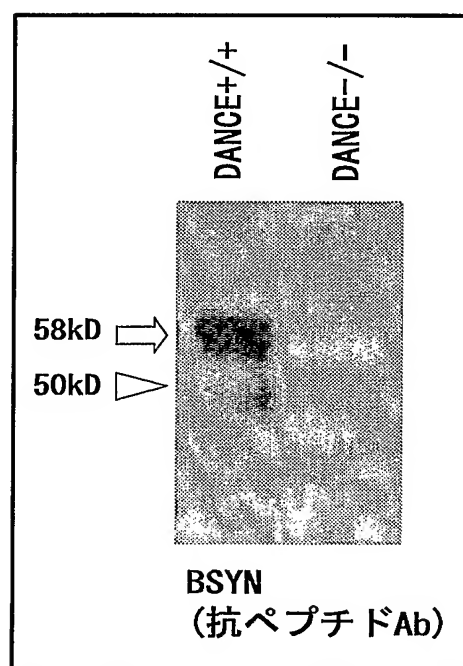


図 4



3/8

図 5

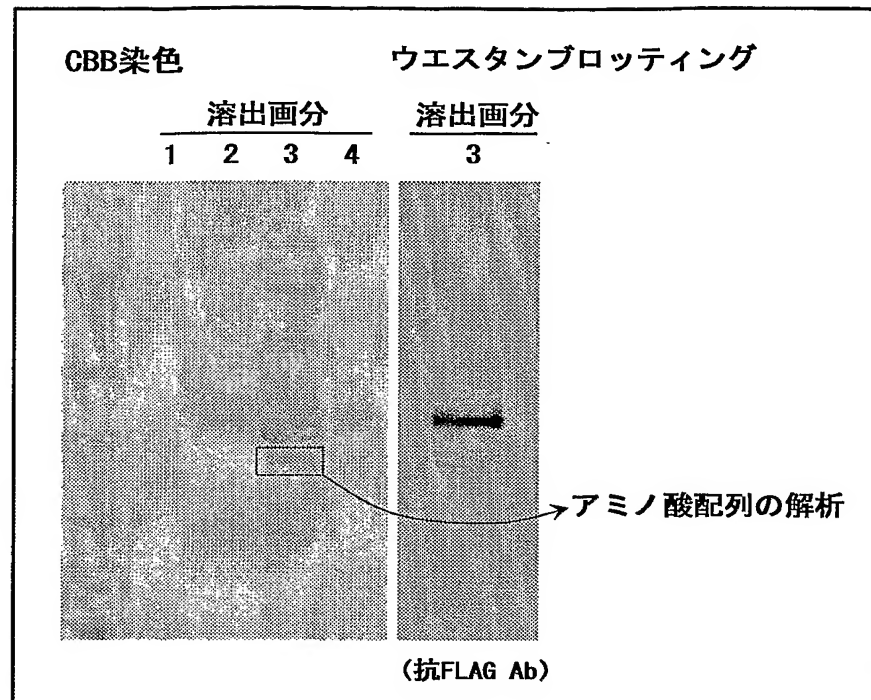
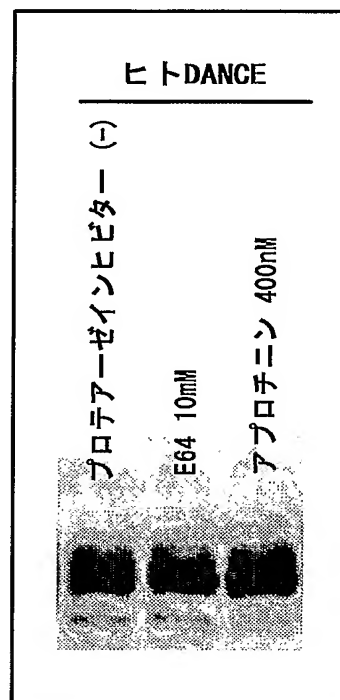


図 6



4/8

図 7

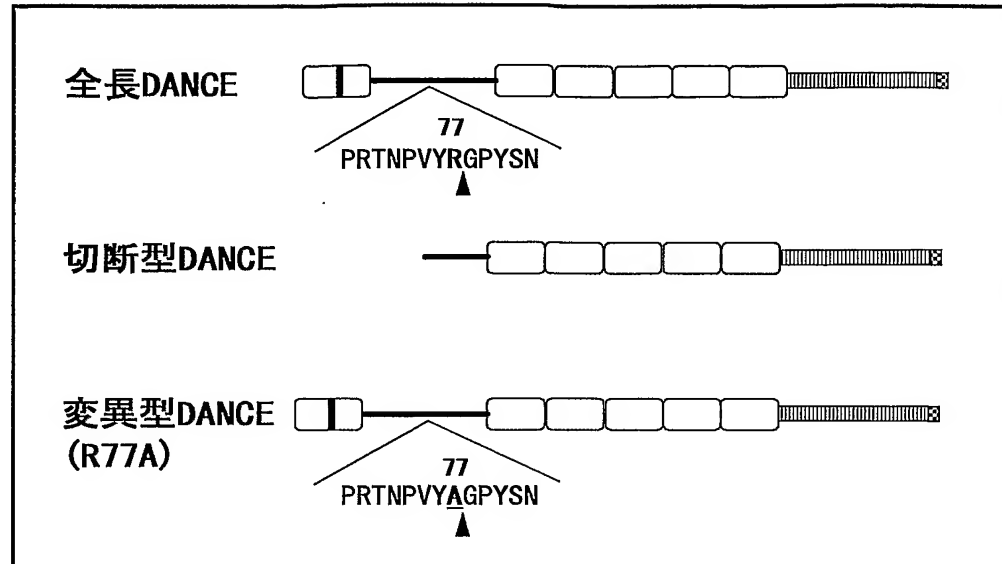
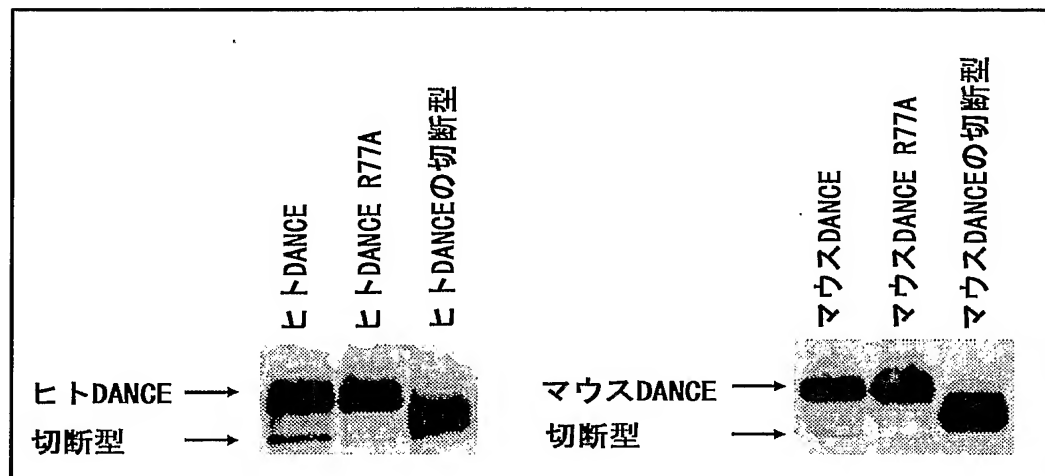
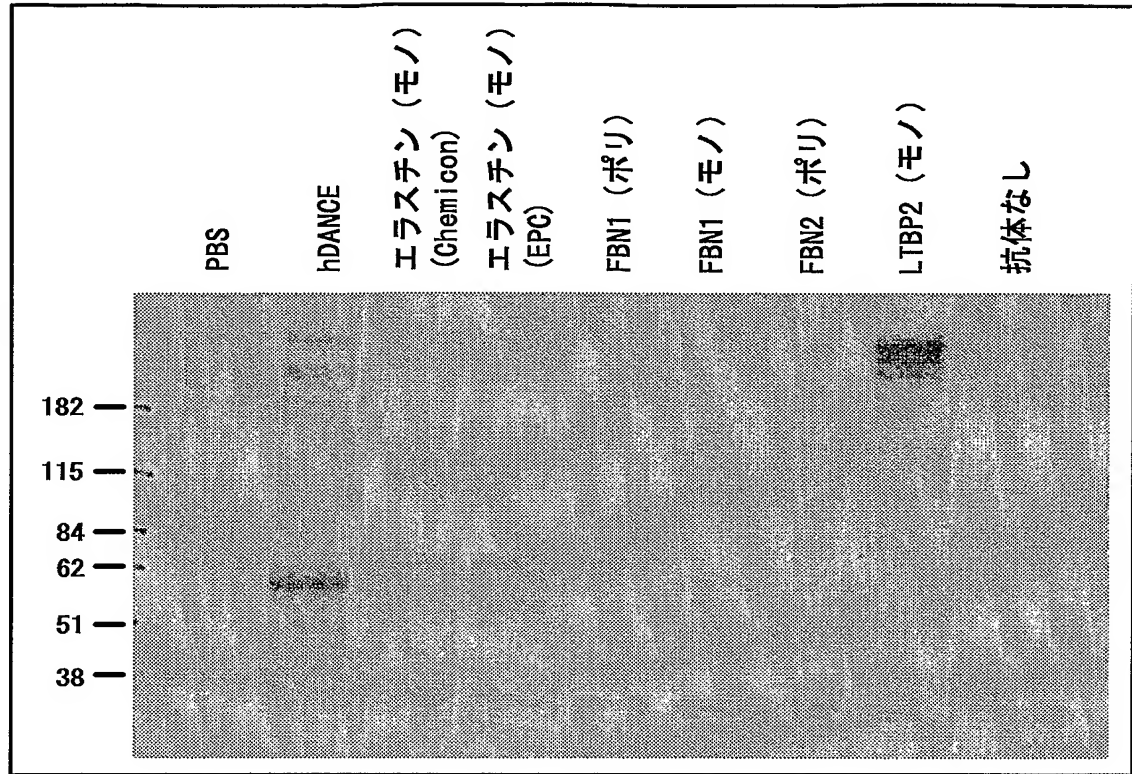


図 8



5/8

図 9



6/8

図 1 0

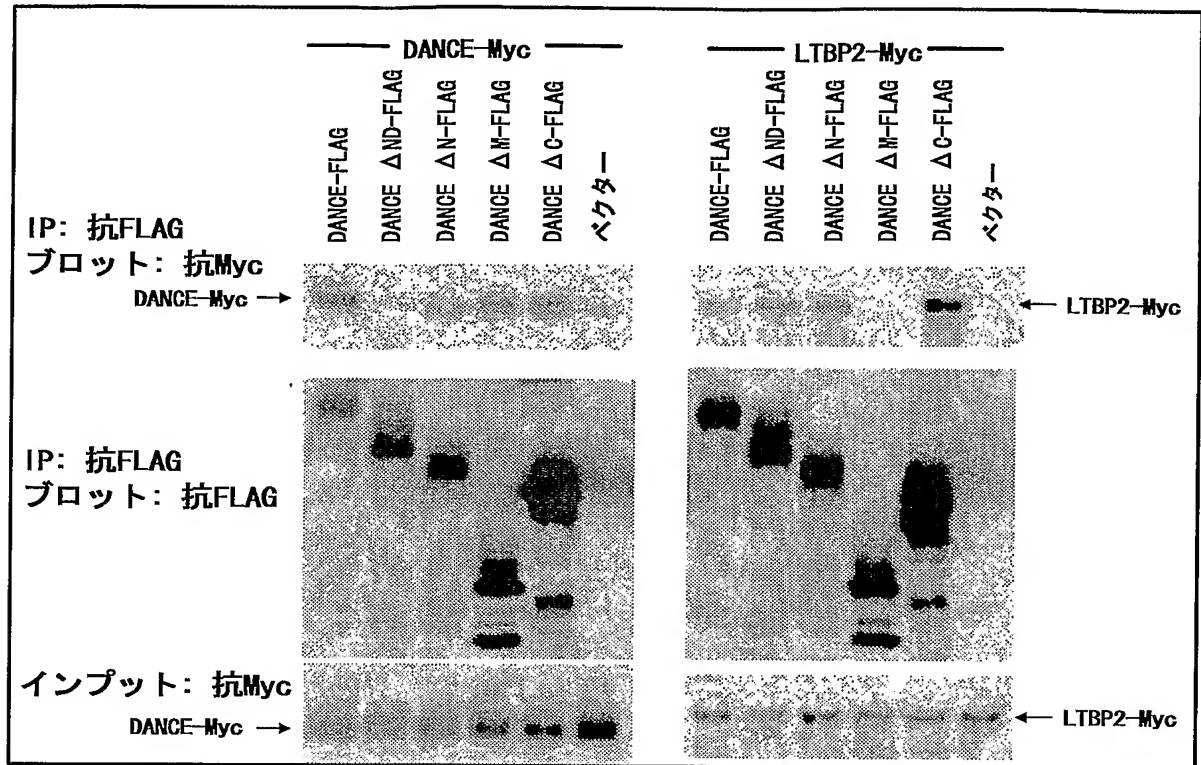
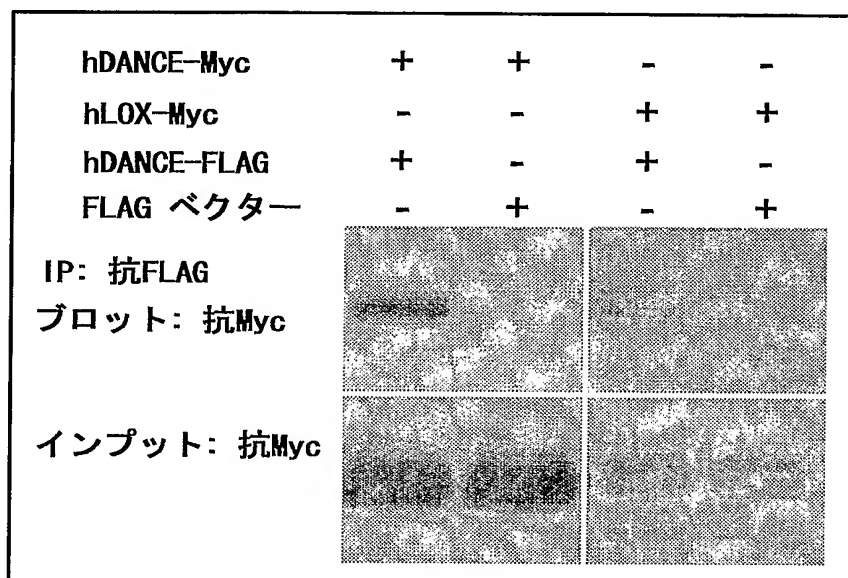
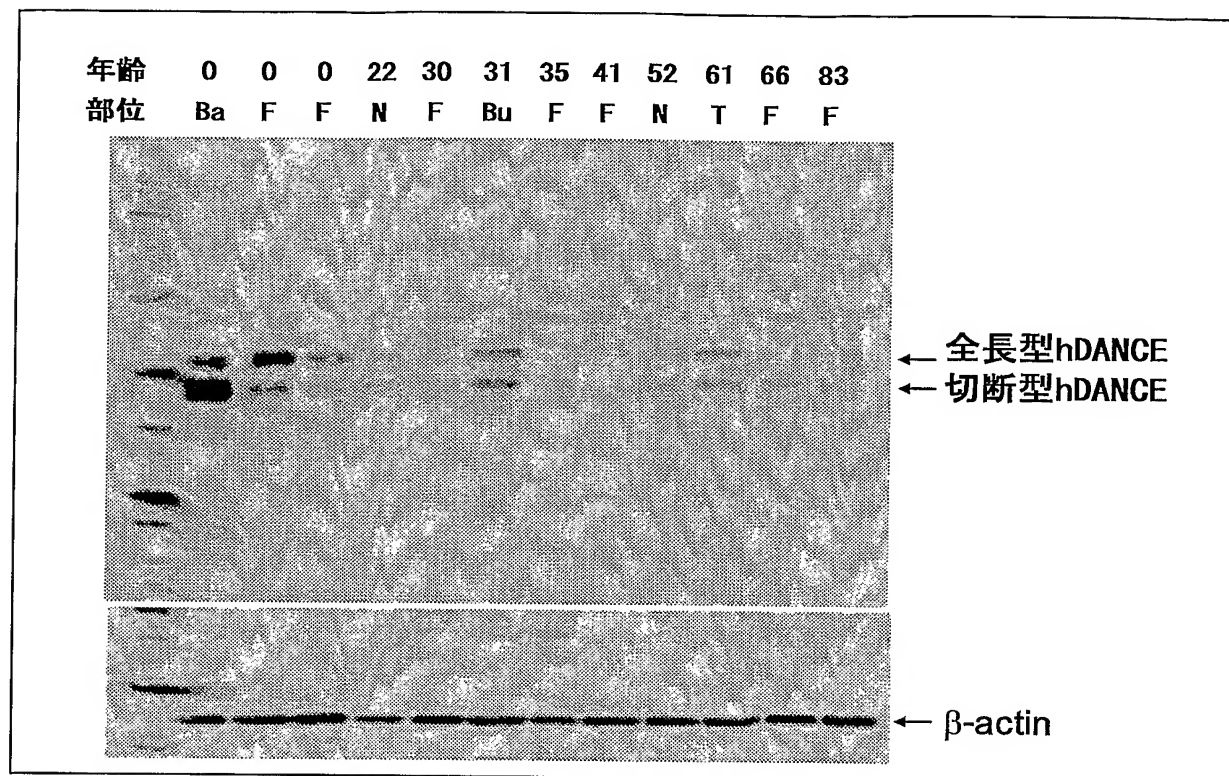


図 1 1



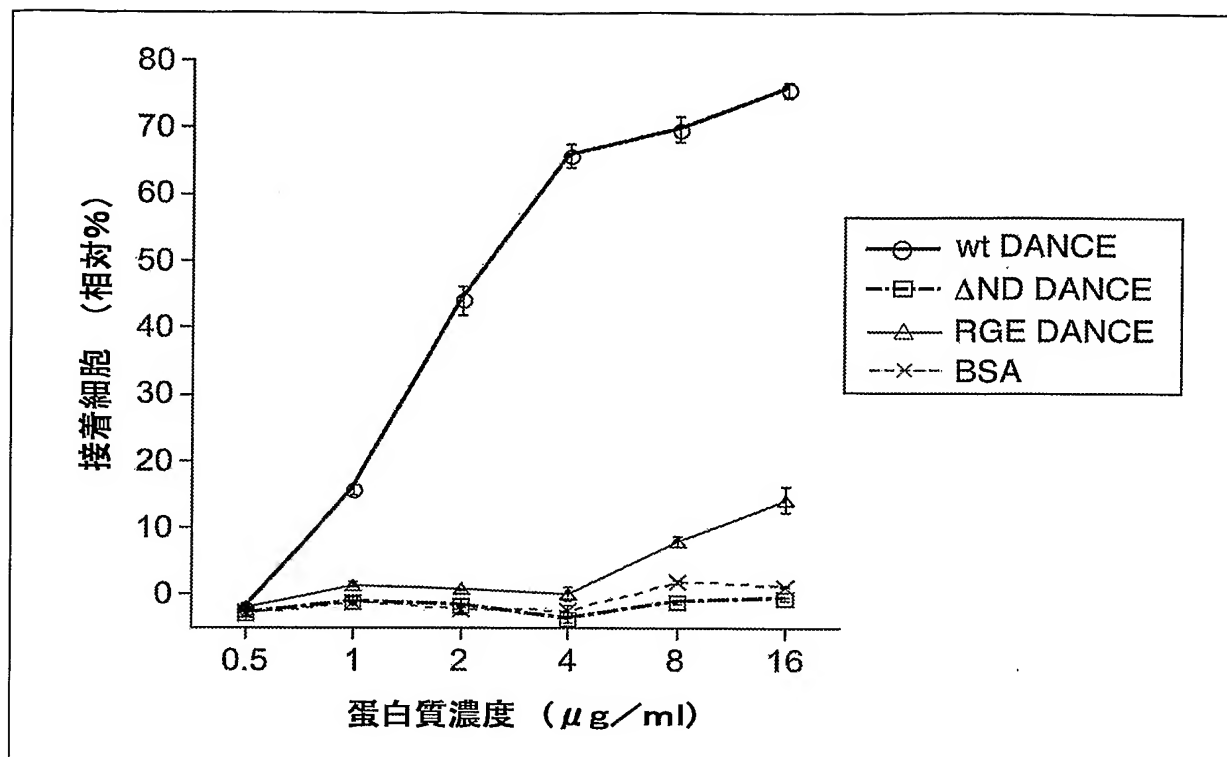
7/8

図 1 2



8/8

図 1 3



1/41

SEQUENCE LISTING

<110> Kyoto University

<120> Cleaved forms of DANCE and DANCE complexes, and methods of screening an agent for regulating formation of elastic fibre using them

<130>

<150> JP 2004-096685

<151> 2004-3-29

<160> 29

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1347

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1347)

<400> 1

atg cca gga ata aaa agg ata ctc act gtt acc att ctg gct ctc tgt	48
Met Pro Gly Ile Lys Arg Ile Leu Thr Val Thr Ile Leu Ala Leu Cys	
1 5 10 15	

ctt cca agc cct ggg aat gca cag gca cag tgc acg aat ggc ttt gac	96
Leu Pro Ser Pro Gly Asn Ala Gln Ala Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp	
20 25 30	

ctg gat cgc cag tca gga cag tgt tta gat att gat gaa tgc cga acc	144
---	-----

2/41

Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr	
35 40 45	
atc ccc gag gcc tgc cga gga gac atg atg tgt gtt aac caa aat ggc	192
Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly	
50 55 60	
ggg tat tta tgc att ccc cgg aca aac cct gtg tat cga ggg ccc tac	240
Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr	
65 70 75 80	
tgc aac ccc tac tgc acc ccc tac tca ggt ccg tac cca gca gct gcc	288
Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Pro Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala	
85 90 95	
cca cca ctc tca gct cca aac tat ccc acg atc tcc agg cct ctt ata	336
Pro Pro Leu Ser Ala Pro Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg Pro Leu Ile	
100 105 110	
tgc cgc ttt gga tac cag atg gat gaa agc aac caa tgt gtg gat gtg	384
Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Ser Asn Gln Cys Val Asp Val	
115 120 125	
gac gag tgt gca aca gat tcc cac cag tgc aac ccc acc cag atc tgc	432
Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys	
130 135 140	
atc aat act gaa ggc ggg tac acc tgc tcc tgc acc gac gga tat tgg	480
Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp	
145 150 155 160	
ctt ctg gaa ggc cag tgc tta gac att gat gaa tgt cgc tat ggt tac	528
Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr	
165 170 175	
tgc cag cag ctc tgt gcg aat gtt cct gga tcc tat tct tgt aca tgc	576

3/41

Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys	
180 185 190	
aac cct ggt ttt acc ctc aat gag gat gga agg tct tgc caa gat gtg	624
Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Glu Asp Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val	
195 200 205	
aac gag tgt gcc acc gag aac ccc tgc gtg caa acc tgc gtc aac acc	672
Asn Glu Cys Ala Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys Val Asn Thr	
210 215 220	
tac ggc tct ttc atc tgc cgc tgt gac cca gga tat gaa ctt gag gaa	720
Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu	
225 230 235 240	
gat ggc gtt cat tgc agt gat atg gac gag tgc agc ttc tct gag ttc	768
Asp Gly Val His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe	
245 250 255	
ctc tgc caa cat gag tgt gtg aac cag ccc ggc aca tac ttc tgc tcc	816
Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Thr Tyr Phe Cys Ser	
260 265 270	
tgc cct cca ggc tac atc ctg ctg gat gac aac cga agc tgc caa gac	864
Cys Pro Pro Gly Tyr Ile Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp	
275 280 285	
atc aac gaa tgt gag cac agg aac cac acg tgc aac ctg cag cag acg	912
Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Asn Leu Gln Gln Thr	
290 295 300	
tgc tac aat tta caa ggg ggc ttc aaa tgc atc gac ccc atc cgc tgt	960
Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Arg Cys	
305 310 315 320	
gag gag cct tat ctg agg atc agt gat aac cgc tgt atg tgt cct gct	1008

4/41

Glu Glu Pro Tyr Leu Arg Ile Ser Asp Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala	
325	330 335
gag aac cct ggc tgc aga gac cag ccc ttt acc atc ttg tac cgg gac 1056	
Glu Asn Pro Gly Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp	
340	345 350
atg gac gtg gtg tca gga cgc tcc gtt ccc gct gac atc ttc caa atg 1104	
Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met	
355	360 365
caa gcc acg acc cgc tac cct ggg gcc tat tac att ttc cag atc aaa 1152	
Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys	
370	375 380
tct ggg aat gag ggc aga gaa ttt tac atg cgg caa acg ggc ccc atc 1200	
Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile	
385	390 395 400
agt gcc acc ctg gtg atg aca cgc ccc atc aaa ggg ccc cgg gaa atc 1248	
Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Glu Ile	
405	410 415
cag ctg gac ttg gaa atg atc act gtc aac act gtc atc aac ttc aga 1296	
Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg	
420	425 430
ggc agc tcc gtg atc cga ctg cgg ata tat gtg tcg cag tac cca ttc 1344	
Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe	
435	440 445

tga

1347

<210> 2

5/41

<211> 448

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Gly Ile Lys Arg Ile Leu Thr Val Thr Ile Leu Ala Leu Cys
1 5 10 15

Leu Pro Ser Pro Gly Asn Ala Gln Ala Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp
 20 25 30

Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr
 35 40 45

Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly
 50 55 60

Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr
65 70 75 80

Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Pro Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala
 85 90 95

Pro Pro Leu Ser Ala Pro Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg Pro Leu Ile
 100 105 110

Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Ser Asn Gln Cys Val Asp Val
 115 120 125

6/41

Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys
130 135 140

Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp
145 150 155 160

Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr
165 170 175

Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys
180 185 190

Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Glu Asp Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val
195 200 205

Asn Glu Cys Ala Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys Val Asn Thr
210 215 220

Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu
225 230 235 240

Asp Gly Val His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe
245 250 255

Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Thr Tyr Phe Cys Ser
260 265 270

7/41

Cys Pro Pro Gly Tyr Ile Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp
275 280 285

Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Asn Leu Gln Gln Thr
290 295 300

Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Arg Cys
305 310 315 320

Glu Glu Pro Tyr Leu Arg Ile Ser Asp Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala
325 330 335

Glu Asn Pro Gly Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp
340 345 350

Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met
355 360 365

Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys
370 375 380

Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile
385 390 395 400

Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Glu Ile
405 410 415

8/41

Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg
 420 425 430

Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe
 435 440 445

<210> 3
 <211> 1278
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1278)

<400> 3
 cag gca cag tgc acg aat ggc ttt gac ctg gat cgc cag tca gga cag 48
 Gln Ala Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln
 1 5 10 15
 tgt tta gat att gat gaa tgc cga acc atc ccc gag gcc tgc cga gga 96
 Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly
 20 25 30
 gac atg atg tgt gtt aac caa aat ggc ggg tat tta tgc att ccc cgg 144
 Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg
 35 40 45
 aca aac cct gtg tat cga ggg ccc tac tgc aac ccc tac tgc acc ccc 192
 Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Pro
 50 55 60

tac tca ggt ccg tac cca gca gct gcc cca cca ctc tca gct cca aac	240
Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala Pro Pro Leu Ser Ala Pro Asn	
65 70 75 80	
tat ccc acg atc tcc agg cct ctt ata tgc cgc ttt gga tac cag atg	288
Tyr Pro Thr Ile Ser Arg Pro Leu Ile Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met	
85 90 95	
gat gaa agc aac caa tgt gtg gat gtg gac gag tgt gca aca gat tcc	336
Asp Glu Ser Asn Gln Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser	
100 105 110	
cac cag tgc aac ccc acc cag atc tgc atc aat act gaa ggc ggg tac	384
His Gln Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr	
115 120 125	
acc tgc tcc tgc acc gac gga tat tgg ctt ctg gaa ggc cag tgc tta	432
Thr Cys Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu	
130 135 140	
gac att gat gaa tgt cgc tat ggt tac tgc cag cag ctc tgt gcg aat	480
Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn	
145 150 155 160	
gtt cct gga tcc tat tct tgt aca tgc aac cct ggt ttt acc ctc aat	528
Val Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn	
165 170 175	
gag gat gga agg tct tgc caa gat gtg aac gag tgt gcc acc gag aac	576
Glu Asp Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Ala Thr Glu Asn	
180 185 190	
ccc tgc gtg caa acc tgc gtc aac acc tac ggc tct ttc atc tgc cgc	624
Pro Cys Val Gln Thr Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg	
195 200 205	

10/41

tgt gac cca gga tat gaa ctt gag gaa gat ggc gtt cat tgc agt gat	672
Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Val His Cys Ser Asp	
210 215 220	
atg gac gag tgc agc ttc tct gag ttc ctc tgc caa cat gag tgt gtg	720
Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val	
225 230 235 240	
aac cag ccc ggc aca tac ttc tgc tcc tgc cct cca ggc tac atc ctg	768
Asn Gln Pro Gly Thr Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Ile Leu	
245 250 255	
ctg gat gac aac cga agc tgc caa gac atc aac gaa tgt gag cac agg	816
Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg	
260 265 270	
aac cac acg tgc aac ctg cag cag acg tgc tac aat tta caa ggg ggc	864
Asn His Thr Cys Asn Leu Gln Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly	
275 280 285	
ttc aaa tgc atc gac ccc atc cgc tgt gag gag cct tat ctg agg atc	912
Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Arg Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Arg Ile	
290 295 300	
agt gat aac cgc tgt atg tgt cct gct gag aac cct ggc tgc aga gac	960
Ser Asp Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu Asn Pro Gly Cys Arg Asp	
305 310 315 320	
cag ccc ttt acc atc ttg tac cgg gac atg gac gtg gtg tca gga cgc	1008
Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg	
325 330 335	
tcc gtt ccc gct gac atc ttc caa atg caa gcc acg acc cgc tac cct	1056
Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro	
340 345 350	

12/41

Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg
35 40 45

Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Pro
50 55 60

Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala Pro Pro Leu Ser Ala Pro Asn
65 70 75 80

Tyr Pro Thr Ile Ser Arg Pro Leu Ile Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met
85 90 95

Asp Glu Ser Asn Gln Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser
100 105 110

His Gln Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr
115 120 125

Thr Cys Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu
130 135 140

Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn
145 150 155 160

Val Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn
165 170 175

13/41

Glu Asp Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Ala Thr Glu Asn
180 185 190

Pro Cys Val Gln Thr Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg
195 200 205

Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Val His Cys Ser Asp
210 215 220

Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val
225 230 235 240

Asn Gln Pro Gly Thr Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Ile Leu
245 250 255

Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg
260 265 270

Asn His Thr Cys Asn Leu Gln Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly
275 280 285

Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Arg Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Arg Ile
290 295 300

Ser Asp Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu Asn Pro Gly Cys Arg Asp
305 310 315 320

14/41

Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg
325 330 335

Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro
340 345 350

Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu
355 360 365

Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr
370 375 380

Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Glu Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile
385 390 395 400

Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu
405 410 415

Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe
420 425

<210> 5

<211> 162

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

15/41

<221> CDS

<222> (1)..(162)

<400> 5

cag gca cag tgc acg aat ggc ttt gac ctg gat cgc cag tca gga cag 48
 Gln Ala Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln
 1 5 10 15

tgt tta gat att gat gaa tgc cga acc atc ccc gag gcc tgc cga gga 96
 Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly
 20 25 30

gac atg atg tgt gtt aac caa aat ggc ggg tat tta tgc att ccc cgg 144
 Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg
 35 40 45

aca aac cct gtg tat cga 162
 Thr Asn Pro Val Tyr Arg
 50

<210> 6

<211> 54

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Ala Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln
 1 5 10 15

Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly
 20 25 30

16/41

Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg
 35 40 45

Thr Asn Pro Val Tyr Arg
 50

<210> 7
 <211> 1116
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1116)

<400> 7
 ggg ccc tac tgc aac ccc tac tgc acc ccc tac tca ggt ccg tac cca 48
 Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Pro Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro
 1 5 10 15
 gca gct gcc cca cca ctc tca gct cca aac tat ccc acg atc tcc agg 96
 Ala Ala Ala Pro Pro Leu Ser Ala Pro Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg
 20 25 30
 cct ctt ata tgc cgc ttt gga tac cag atg gat gaa agc aac caa tgt 144
 Pro Leu Ile Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Ser Asn Gln Cys
 35 40 45
 gtg gat gtg gac gag tgt gca aca gat tcc cac cag tgc aac ccc acc 192
 Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr
 50 55 60
 cag atc tgc atc aat act gaa ggc ggg tac acc tgc tcc tgc acc gac 240

[illegible]

18/41

Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Asn Leu	
210	215 220
cag cag acg tgc tac aat tta caa ggg ggc ttc aaa tgc atc gac ccc 720	
Gln Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro	
225	230 235 240
atc cgc tgt gag gag cct tat ctg agg atc agt gat aac cgc tgt atg 768	
Ile Arg Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Arg Ile Ser Asp Asn Arg Cys Met	
	245 250 255
tgt cct gct gag aac cct ggc tgc aga gac cag ccc ttt acc atc ttg 816	
Cys Pro Ala Glu Asn Pro Gly Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu	
	260 265 270
tac cgg gac atg gac gtg gtg tca gga cgc tcc gtt ccc gct gac atc 864	
Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile	
	275 280 285
ttc caa atg caa gcc acg acc cgc tac cct ggg gcc tat tac att ttc 912	
Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe	
	290 295 300
cag atc aaa tct ggg aat gag ggc aga gaa ttt tac atg cgg caa acg 960	
Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr	
305	310 315 320
ggc ccc atc agt gcc acc ctg gtg atg aca cgc ccc atc aaa ggg ccc 1008	
Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro	
	325 330 335
cgg gaa atc cag ctg gac ttg gaa atg atc act gtc aac act gtc atc 1056	
Arg Glu Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile	
	340 345 350
aac ttc aga ggc agc tcc gtg atc cga ctg cgg ata tat gtg tcg cag 1104	

19/41

Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln
 355 360 365

tac cca ttc tga
 Tyr Pro Phe
 370

1116

<210> 8
 <211> 371
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Pro Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Pro Pro Leu Ser Ala Pro Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg
 20 25 30

Pro Leu Ile Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Ser Asn Gln Cys
 35 40 45

Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr
 50 55 60

Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp
 65 70 75 80

Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg

20/41

85

90

95

Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser
 100 105 110

Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Glu Asp Gly Arg Ser Cys
 115 120 125

Gln Asp Val Asn Glu Cys Ala Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys
 130 135 140

Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu
 145 150 155 160

Leu Glu Glu Asp-Gly Val His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe
 165 170 175

Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Thr Tyr
 180 185 190

Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Ile Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser
 195 200 205

Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Asn Leu
 210 215 220

Gln Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro

225 230 235 240

Tyr Pro Phe

22/41

370

<210> 9

<211> 162

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(162)

<400> 9

cag cag cag tgc aca aac ggc ttt gac ctg gac cgc cag tca gga cag 48
Gln Gln Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln
1 5 10 15

tgt cta gat att gat gaa tgc cgg acc atc cct gag gct tgt cgt ggg 96
Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly
20 25 30

gac atg atg tgt gtc aac cag aat ggc ggg tat ttg tgc atc cct cga 144
Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg
35 40 45

acc aac cca gtg tat cga 162
Thr Asn Pro Val Tyr Arg
50

<210> 10

<211> 54

<212> PRT

<213> Mus musculus

23/41

<400> 10

Gln Gln Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln
 1 5 10 15

Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly
 20 25 30

Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg
 35 40 45

Thr Asn Pro Val Tyr Arg
 50

<210> 11

<211> 1113

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1113)

<400> 11

ggg cct tac tca aat ccc tac tct aca tcc tac tca ggc cca tac cca 48
 Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro
 1 5 10 15

gca gcg gcc cca cca gta cca gct tcc aac tac ccc acg att tca agg 96
 Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Ala Ser Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg
 20 25 30

24/41

cct ctt gtc tgc cgc ttt ggg tat cag atg gat gaa ggc aac cag tgt	144
Pro Leu Val Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Gly Asn Gln Cys	
35 40 45	
gtg gat gtg gac gag tgt gca aca gac tca cac cag tgc aac cct acc	192
Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr	
50 55 60	
cag atc tgt atc aac act gaa gga ggt tac acc tgc tcc tgc acc gat	240
Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp	
65 70 75 80	
ggg tac tgg ctt ctg gaa ggg cag tgc cta gat att gat gaa tgt cgc	288
Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg	
85 90 95	
tat ggt tac tgc cag cag ctc tgt gca aat gtt cca gga tcc tat tcc	336
Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser	
100 105 110	
tgt aca tgc aac cct ggt ttc acc ctc aac gac gat gga agg tct tgc	384
Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp Gly Arg Ser Cys	
115 120 125	
caa gat gtg aac gag tgc gaa act gag aat ccc tgt gtt cag acc tgt	432
Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys	
130 135 140	
gtc aac acc tat ggc tct ttc atc tgc cgc tgt gac cca gga tat gaa	480
Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu	
145 150 155 160	
ctt gag gaa gat ggc att cac tgc agt gat atg gac gag tgc agc ttc	528
Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe	
165 170 175	

25/41

tcc gag ttc ctc tgt caa cac gag tgt gtg aac cag ccg ggc tca tac	576
Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser Tyr	
180 185 190	
ttc tgc tcg tgc cct cca ggc tac gtc ctg ttg gat gat aac cga agc	624
Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser	
195 200 205	
tgc cag gat atc aat gaa tgt gag cac cga aac cac acg tgt acc tca	672
Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Thr Ser	
210 215 220	
ctg cag act tgc tac aat cta caa ggg ggc ttc aaa tgt att gat ccc	720
Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro	
225 230 235 240	
atc agc tgt gag gag cct tat ctg ctg att ggt gaa aac cgc tgt atg	768
Ile Ser Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Glu Asn Arg Cys Met	
245 250 255	
tgt cct gct gag cac acc agc tgc aga gac cag cca ttc acc atc ctg	816
Cys Pro Ala Glu His Thr Ser Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu	
260 265 270	
tat cgg gac atg gat gtg gtg tca gga cgc tcc gtt cct gct gac atc	864
Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile	
275 280 285	
ttc cag atg caa gca aca acc cga tac cct ggt gcc tat tac att ttc	912
Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe	
290 295 300	
cag atc aaa tct ggc aac gag ggt cga gag ttc tat atg cgg caa aca	960
Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr	
305 310 315 320	

26/41

ggg cct atc agt gcc acc ctg gtg atg aca cgc ccc atc aaa ggg cct 1008
 Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro
 325 330 335

cgg gac atc cag ctg gac ttg gag atg atc act gtc aac act gtc atc 1056
 Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile.
 340 345 350

aac ttc aga ggc agc tcc gtg atc cga ctg cgg ata tat gtg tcg cag 1104
 Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln
 355 360 365

tat ccg ttc 1113
 Tyr Pro Phe
 370

<210> 12

<211> 371

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Ala Ser Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg
 20 25 30

Pro Leu Val Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Gly Asn Gln Cys
 35 40 45

27/41

Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr
50 55 60

Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp
65 70 75 80

Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg
85 90 95

Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser
100 105 110

Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp Gly Arg Ser Cys
115 120 125

Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys
130 135 140

Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu
145 150 155 160

Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe
165 170 175

Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser Tyr
180 185 190

28/41

Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser
195 200 205

Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Thr Ser
210 215 220

Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro
225 230 235 240

Ile Ser Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Glu Asn Arg Cys Met
245 250 255

Cys Pro Ala Glu His Thr Ser Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu
260 265 270

Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile
275 280 285

Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe
290 295 300

Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr
305 310 315 320

Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro
325 330 335

29/41

Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile
 340 345 350

Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln
 355 360 365

Tyr Pro Phe
 370

<210> 13
 <211> 162
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(162)

<400> 13
 cag caa cag tgc acc aac ggc ttt gac ctg gac cgc cag aca gga cag 48
 Gln Gln Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Thr Gly Gln
 1 5 10 15
 tgt tta gat att gat gaa tgt cgg acc atc cct gag gct tgc cgt ggg 96
 Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly
 20 25 30
 gac atg atg tgt gtc aac cag aat ggc ggg tat ctg tgc atc cct cga 144
 Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg
 35 40 45

30/41

acc aac cca gtg tat cga
Thr Asn Pro Val Tyr Arg
50

162

<210> 14
<211> 54
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 14

Gln Gln Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Thr Gly Gln
1 5 10 15

Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly
20 25 30

Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg
35 40 45

Thr Asn Pro Val Tyr Arg
50

<210> 15
<211> 1116
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS

31/41

<222> (1)..(1116)

<400> 15

ggg ccc tac tcc aat ccc tac tct aca tcc tac tca ggc cca tac cca 48
 Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro
 1 5 10 15

gca gcc gca cca cca gtg cca gct tcc aac tac ccc acg att tcc agg 96
 Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Ala Ser Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg
 20 25 30

cct ctt gtc tgt cgc ttt ggg tat cag atg gat gaa ggc aac cag tgt 144
 Pro Leu Val Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Gly Asn Gln Cys
 35 40 45

gtg gat gtg gac gag tgt gcg aca gat tca cac cag tgc aac cct acc 192
 Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr
 50 55 60

cag atc tgt atc aac acg gaa gga ggg tac acc tgc tcc tgc act gat 240
 Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp
 65 70 75 80

ggg tac tgg ctt ctg gaa ggg cag tgc cta gat att gat gaa tgt cgc 288
 Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg
 85 90 95

tat ggt tac tgc cag cag ctc tgt gcg aat gtt cct gga tcc tat tcc 336
 Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser
 100 105 110

tgt acg tgt aac cct ggc ttc acc ctc aac gat gat gga agg tct tgc 384
 Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp Gly Arg Ser Cys
 115 120 125

caa gat gtg aac gag tgt gaa act gag aac ccc tgt gtt cag acc tgc 432

32/41

Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys	
130	135 140
gtc aac acc tat ggt tct ttc atc tgc cgc tgt gac cca gga tat gaa	480
Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu	
145	150 155 160
ctg gag gaa gat ggc att cac tgc agt gat atg gat gag tgc agc ttc	528
Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe	
	165 170 175
tcc gag ttc ctc tgt caa cat gag tgt gtg aac cag ccg ggc tca tac	576
Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser Tyr	
	180 185 190
ttc tgc tca tgc cct cca ggc tac gtc ttg ttg gaa gat aac cga agc	624
Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Glu Asp Asn Arg Ser	
	195 200 205
tgc cag gat atc aat gaa tgt gag cac cgg aac cac aca tgc act ccc	672
Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Thr Pro	
	210 215 220
ctg cag act tgc tac aat ctg caa ggg ggc ttc aaa tgt atc gac ccc	720
Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro	
	225 230 235 240
atc gtc tgc gag gag cct tat ctg ctg att ggg gat aac cgc tgt atg	768
Ile Val Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Asp Asn Arg Cys Met	
	245 250 255
tgc cct gct gag aat act ggc tgc agg gac cag cca ttc acc atc ttg	816
Cys Pro Ala Glu Asn Thr Gly Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu	
	260 265 270
ttt cgg gac atg gat gtg gta tca gga cgc tct gtt cct gct gac atc	864

33/41

Phe Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile
 275 280 285

ttc cag atg caa gca acg acc cga tac cct ggc gcc tat tac att ttc 912
 Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe
 290 295 300

cag atc aaa tct ggg aac gag ggt cga gag ttc tac atg cgg caa aca 960
 Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr
 305 310 315 320

ggg cct atc agt gcc acc ctg gtg atg aca cgc ccc atc aaa ggg cct 1008
 Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro
 325 330 335

cgg gac atc cag ctg gac ttg gag atg atc acc gtc aac act gtc atc 1056
 Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile
 340 345 350

aac ttc aga ggc agc tcc gtg atc cga ctg cgg ata tac gtg tcc cag 1104
 Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln
 355 360 365

tat ccg ttc tga 1116
 Tyr Pro Phe
 370

<210> 16

<211> 371

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 16

Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro

34/41

1

5

10

15

Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Ala Ser Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg
20 25 30

Pro Leu Val Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Gly Asn Gln Cys
35 40 45

Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr
50 55 60

Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp
65 70 75 80

Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg
85 90 95

Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser
100 105 110

Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp Gly Arg Ser Cys
115 120 125

Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys
130 135 140

Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu

35/41

145		150		155		160									
Leu	Glu	Glu	Asp	Gly	Ile	His	Cys	Ser	Asp	Met	Asp	Glu	Cys	Ser	Phe
				165					170					175	
Ser	Glu	Phe	Leu	Cys	Gln	His	Glu	Cys	Val	Asn	Gln	Pro	Gly	Ser	Tyr
			180						185					190	
Phe	Cys	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Tyr	Val	Leu	Leu	Glu	Asp	Asn	Arg	Ser
			195					200					205		
Cys	Gln	Asp	Ile	Asn	Glu	Cys	Glu	His	Arg	Asn	His	Thr	Cys	Thr	Pro
	210						215				220				
Leu	Gln	Thr	Cys	Tyr	Asn	Leu	Gln	Gly	Gly	Phe	Lys	Cys	Ile	Asp	Pro
225					230					235					240
Ile	Val	Cys	Glu	Glu	Pro	Tyr	Leu	Leu	Ile	Gly	Asp	Asn	Arg	Cys	Met
			245						250					255	
Cys	Pro	Ala	Glu	Asn	Thr	Gly	Cys	Arg	Asp	Gln	Pro	Phe	Thr	Ile	Leu
			260						265				270		
Phe	Arg	Asp	Met	Asp	Val	Val	Ser	Gly	Arg	Ser	Val	Pro	Ala	Asp	Ile
		275						280				285			
Phe	Gln	Met	Gln	Ala	Thr	Thr	Arg	Tyr	Pro	Gly	Ala	Tyr	Tyr	Ile	Phe

36/41

290

295

300

Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr
 305 310 315 320

Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro
 325 330 335

Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile
 340 345 350

Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln
 355 360 365

Tyr Pro Phe
 370

<210> 17

<211> 173

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> DNA encoding preprotrypsin signal peptide, FLAG tag, 6 x His tag
 and restriction sites

<400> 17

ggtaccgcta gccaattcac catgtctgca cttctgatcc tagctcttgt tggagctgca 60

gttgctgact acaaagacga tgacgacaag actagtcac atcaccatca ccattctaga 120

37/41

gaaggatccg atatccgcgg ccgcacgat tgactagctg aggccgcaaa ccc

173

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> preprotrypsin signal peptide

<400> 18

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala

1

5

10

15

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> FLAG tag

<400> 19

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

38/41

<220>

<223> 6 x His tag

<400> 20

His His His His His His

1

5

<210> 21

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> DNA encoding preprotrypsin signal peptide, Myc tag and restriction sites

<400> 21

gaattcacca tgtctgcact tctgataccta gctcttggtg gagctgcagt tgctgactac 60

gaagaggacg aacaaaaact catctcagaa gaggatctga ctagt 105

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Myc tag

<400> 22

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

39/41

1 5 10

<210> 23

<211> 143

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> DNA encoding FLAG tag, 6 x His tag and restriction sites

<400> 23

tggtaccgag ctcggatcca ctagtccagt gtggtggaat tctgcagata tccagcacag 60

tggcggcgt ctagagacta caaagacgat gacgacaaga gaggggtctca tcattccat 120

caccattgag cggccgcaaa ccc 143

<210> 24

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying human DANCE

<400> 24

tctagagcac agtgcacgaa tggctttg 28

<210> 25

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

40/41

<220>

<223> PCR primer for amplifying human DANCE

<400> 25

gcggccggtc agaatgggta ctgcgacaca tatatccg

38

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying human LTBP2

<400> 26

tctagacaaa gggaccccggt agggagatac gag

33

<210> 27

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying human LTBP2

<400> 27

gcggccgcct ggtactcctt ggcagtcag tggg

34

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

41/41

<220>

<223> PCR primer for amplifying human DANCE

<400> 28

gaattctttct tctcgccttc gcattctctc c

31

<210> 29

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying human DANCE

<400> 29

tctagagaat gggtactgcg acacatatat ccg

33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004274

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/09, A61K38/46, 45/00, 48/00, A61P9/00, 9/10, 11/00, 17/00, 17/02, 43/00, C07K14/47, 16/18, C12N9/64, C12P21/08, C12Q1/26, 1/37, G01N33/15, 33/50, 33/53, 33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/09, A61K38/46, 45/00, 48/00, A61P9/00, 9/10, 11/00, 17/00, 17/02, 43/00, C07K14/47, 16/18, C12N9/64, C12P21/08, C12Q1/26, 1/37, G01N33/15, 33/50, 33/53, 33/566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	T. NAKAMURA et al., DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon-injured arteries, J.Biol.Chem, 274(32), 1999, 22476-83	10, 11
X	X.Liu et al., Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein, Nat.Genet., 36(2), 2004.02, 178-82	19, 21, 27, 33
A	Tomoyuki NAKAMURA, "Roka to Shin Kekkanbyo Kenkyu no Shintenkai Kekkan Saibogai Kishitsu to Roka", Molecular Cardiovascular Medicine, 3(5), 2002, 547-54	1-27, 29, 33, 34



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 April, 2005 (15.04.05)

Date of mailing of the international search report

14 June, 2005 (14.06.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004274

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

[illegible]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004274

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: parts of 1, 5 and 12, 28 and 30-32
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See extra sheet.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet (2)

With respect to claims 1-15, 22-24 and 28-34:

It is unclear for what purposes use is made of, claimed in these claims, "polypeptide", "polynucleotide" coding for the same, "antibody" having specific affinity with the polypeptide, "DANCE variant", "polynucleotide" coding for the DANCE variant, "method of screening a substance capable of regulating the activity of DANCE-specific protease", "method of screening DANCE-specific protease", "DANCE-specific protease", "polynucleotide" coding for the DANCE-specific protease, "kit" and "method of identifying DANCE-specific protease expression cells".

Examples, etc. describe that DANCE is in vitro or in vivo cleaved by protease, and that with respect to truncated DANCE, it is presumed that (1) it no longer binds to cell surface integrin, (2) DANCE molecules no longer bind to each other and (3) the binding to LTBP2 is stronger than that to full-length DANCE (see Consideration 3), and that DANCE having an aminoterminal domain cleaved exhibits substantially no activity of generating of elastic fibrous tissue (see Referential Example 2). Consequently, it is proved that the amino terminal domain of DANCE is needed for generating of elastic fibrous tissue. However, there is no description with respect to the correlation between the in vivo cleavage of DANCE by protease and the regulation of generating of elastic fibrous tissue. Consequently, it cannot be stated that the regulation of activity of DANCE-specific protease is associated with the regulation of generating of elastic fibrous tissue and that a substance capable of regulation of activity of DANCE-specific protease is a regulator of generating of elastic fibrous tissue. Thus, it is unclear for what purposes use is made of the screening method for the substance (claim 22). Further, the utility of, used in the screening method, polypeptide obtained by cleavage of DANCE, antibody against the polypeptide, DANCE variant, etc. is unclear.

Therefore, the inventions of these claims cannot be stated as fully supported by the description and cannot be stated as clearly and fully disclosed to such an extent that experts of the technical field to which the inventions pertain can carry out the inventions.

With respect to claims 1 and 5:

The language "substantially identical" used in these claims causes the scope of invention to be unclear, so that these claims cannot be stated as being clearly drafted. In particular, in the description, it is described that "with respect to substantially identical amino acid sequences, an amino acid sequence having an identity of .. (omitted) .. about $\geq 70\%$.. (omitted) .. can be used" (see page 10). The term "about" causes the scope of invention to be unclear.

Further, the probability that for example, a polypeptide of amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 or 8 wherein there has occurred 30 amino acids substitution, deletion, insertion or addition, or amino acid sequence of 70% identity thereto has substantially the same activity as that of the original polypeptide of amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 or 8 is low. Obtaining the modified polypeptide requires excessive trial and error from persons skilled in the art to which the invention pertains.

(continued to further extra sheet)

(continuation from previous extra sheet)

Consequently, the inventions of these claims cannot be stated as fully supported by the description and cannot be stated as clearly and fully disclosed to such an extent that experts of the technical field to which the inventions pertain can carry out the inventions.

With respect to claims 3 and 7:

It is unclear whether "consisting of .. sequence" or "containing .. sequence" is meant by the expression "having .. sequence" used in these claims. Therefore, these claims are not clearly drafted.

With respect to claim 12:

With respect to the "method" of this claim, what is the purpose of the method of measuring cleavage amount is unclear. Consequently, this claim is not clearly drafted. Further, this method is not restricted to cleavage by DANCE-specific protease, but methods of cleavage by other means cannot be stated as being fully supported by the description and are not clearly and fully disclosed to such an extent that experts of the technical field to which the invention pertains cannot carry out the methods.

With respect to the inventions of these claims claimed by unclear drafting or not fully supported by the description and not clearly and fully disclosed in the description, no international search has been carried out.

With respect to claim 24:

It appears that the "animals" of this claim include human being.

With respect to claims 28 and 30-32:

It is unclear what particular compounds are meant by the "regulator of generating of elastic fibrous tissue" and "DANCE-specific protease" appearing in these claims. Consequently, these claims cannot be stated as being clearly drafted. Further, the inventions of these claims cannot be stated as being fully supported by the description and are not clearly and fully disclosed to such an extent that experts of the technical field to which the inventions pertain cannot carry out the inventions.

With respect to the inventions of these claims claimed by unclear drafting or not fully supported by the description and not clearly and fully disclosed in the description, no search has been carried out.

With respect to claim 33:

It is unclear for what purpose the "kit" of this claim is used. Further, it is unclear how the polynucleotide is used. Consequently, this claim cannot be stated as being clearly drafted. Further, the invention of this claim cannot be stated as being fully supported by the description and is not clearly and fully disclosed to such an extent that experts of the technical field to which the invention pertains cannot carry out the invention.

With respect to claims 16-21, 25-28 and 33:

It is unclear for what purposes use is made of, claimed in these claims, "DANCE complex", "method of preparing DANCE complex", "method of screening a substance capable of regulating the formation of DANCE complex" and "kit".

(continued to further extra sheet)

(continuation from previous extra sheet)

Referring to Examples, etc., although forming of a complex from DANCE is described (Example 5), there is no description with respect to the correlation between the DANCE complex and the regulation of generating of elastic fibrous tissue.

Consequently, it cannot be stated that the regulation of formation of DANCE complex is associated with the regulation of generating of elastic fibrous tissue and that a substance capable of regulation of formation of DANCE complex is a regulator of generating of elastic fibrous tissue. Thus, for what purposes use is made of the screening method for the substance (claim 25) is unclear. Further, the utility of, used in the screening method, DANCE complex, etc. is unclear.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

The inventions of claims 1-15, 22-24, 29-32 and 34 relate to a polypeptide obtained by cleavage of DANCE by DANCE-specific protease, while the inventions of claims 16-21 and 25-27 relate to a DANCE complex. Accordingly, the matter common to these two invention groups relates to DANCE. However, this matter is publicly known as described in, for example, the reference:

T. Nakamura, et. al., DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon-injured arteries, J Biol Chem, 274(32), 1999, 22476-83.

Therefore, the invention claimed in claims 1-15, 22-24, 29-32 and 34 and the invention claimed in claims 16-21 and 25-27 cannot be stated as being a group of inventions linked with each other so as to form a single general inventive concept, and it appears that the invention group consists of two different inventions. Further, it appears that claims 28 and 33 individually involve two different inventions.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09, A61K38/46, 45/00, 48/00, A61P9/00, 9/10, 11/00, 17/00, 17/02, 43/00, C07K14/47, 16/18, C12N9/64, C12P21/08, C12Q1/26, 1/37, G01N33/15, 33/50, 33/53, 33/566

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09, A61K38/46, 45/00, 48/00, A61P9/00, 9/10, 11/00, 17/00, 17/02, 43/00, C07K14/47, 16/18, C12N9/64, C12P21/08, C12Q1/26, 1/37, G01N33/15, 33/50, 33/53, 33/566

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	T. Nakamura, et. al., DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon-injured arteries, J Biol Chem, 274(32), 1999, 22476-83	10, 11
X	X. Liu, et. al, Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein, Nat Genet, 36(2), 2004.02, 178-82	19, 21, 27, 33
A	中邨智之, 老化と心血管病研究の新展開 血管細胞外基質と老化, 分子心血管病, 3 (5), 2002, 547-54	1-27, 29, 33, 34

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.04.2005

国際調査報告の発送日 14.6.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

阪野 誠司

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

9286

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	P. P. Kuang, et. al, Coordinate expression of fibulin-5/DANCE and elastin during lung injury repair, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 285(5), 2003, L1147-52	1-27, 29, 33, 34
P, A	E. Tsuruga, et. al, Induction of fibulin-5 gene is regulated by tropoelastin gene, and correlated with tropoelastin accumulation in vitro, Int J Biochem Cell Biol, 36(3), 2004. 03, 395-400	1-27, 29, 33, 34
A	W. P. Schiemann , Context-specific effects of fibulin-5 (DANCE/EVEC) on cell proliferation, motility, and invasion. Fibulin-5 is induced by transforming growth factor-beta and affects protein kinase cascades, J Biol Chem, 277(30), 2002, 27367-77	1-27, 29, 33, 34
A	K. S. Midwood , Elastic fibers: building bridges between cells and their matrix, Curr Biol, 12(8), 2002, R279-81	1-27, 29, 33, 34
A	H. Yanagisawa, et. al, Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo, Nature, 415(6868), 2002, 168-71	1-27, 29, 33, 34
A	T. Nakamura, et. al, Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo, Nature, 415(6868), 2002, 171-5	1-27, 29, 33, 34

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1,5,12の一部、28,30-32 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
特別ページを参照。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。
特別ページを参照。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅱ欄について

請求の範囲1—15、22—24、28—34

上記請求の範囲における「ポリペプチド」及びそれをコードする「ポリヌクレオチド」、該ポリペプチドに特異的親和性を有する「抗体」、「DANCE 変異体」及びそれをコードする「ポリヌクレオチド」、「DANCE 特異的プロテアーゼの活性を調節し得る物質のスクリーニング方法」、「DANCE 特異的プロテアーゼのスクリーニング方法」、「DANCE 特異的プロテアーゼ」及びそれをコードする「ポリヌクレオチド」、「キット」、並びに、「DANCE 特異的プロテアーゼ発現細胞の同定方法」は、何に使用されるものか不明である。

実施例等では、DANCE がプロテアーゼにより *in vitro* または *in vivo* で切断されること、切断型 DANCE は(1)細胞表面インテグリンと結合しなくなり、(2)DANCE 同士で結合しなくなり、(3)全長 DANCE よりも LTBP2 との結合が強くなることが推測されること（考察3参照）、並びに、アミノ末端ドメインの切断された DANCE が弾性線維形成活性がほとんどないことが示され（参考例2参照）、DANCE のアミノ末端ドメインが弾性線維形成に必要であることは実証されているものの、生体内におけるプロテアーゼによる DANCE の切断と弾性線維形成の調節との相関関係については何ら示されていない。そうしてみると、DANCE 特異的プロテアーゼの活性の調節が、弾性線維形成の調節と関連しているとはいえず、DANCE 特異的プロテアーゼの活性を調節し得る物質が弾性線維形成調節剤であるとはいえず、該物質のスクリーニング方法（請求の範囲22）は何に使用するものか不明である。また、該スクリーニング方法に使用する DANCE の切断により得られるポリペプチド、該ポリペプチドの抗体、DANCE 変異体等は、有用性が不明である。

したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

請求の範囲1、5

上記請求の範囲における「実質的に同一」という記載は、発明の範囲を不明確とするものであり、上記請求の範囲は明確に記載されているとはいえない。即ち、明細書中、「実質的に同一なアミノ酸配列とは、（中略）約70%以上（中略）の同一性を有するアミノ酸配列を用いることもできる」とあるが（第10頁参照）、「約」という記載は、発明の範囲を不明確とするものである。

また、例えば、配列番号6又は8で表されるアミノ酸配列において30個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列、または、70%の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドが、もとの配列番号6又は8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドと実質的に同質の活性を有する蓋然性は低く、該変異したポリペプチドを得ることは、当業者に過度な試行錯誤を必要とするものである。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、請求の範囲が明確に記載されておらず、また、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない上記請求の範囲に係る発明については、国際調査を行っていない。

請求の範囲 3、7

上記請求の範囲における「・・・配列を有する」という記載は、「・・・配列からなる」ことを意味するのか、「・・・配列を含む」ことを意味するのか不明である。したがって、上記請求の範囲は明確に記載されていない。

請求の範囲 1 2

上記請求の範囲における「方法」は、何を目的として切断量を測定する方法か不明である。したがって、上記請求の範囲は明確に記載されていない。また、該方法は、DANCE 特異的プロテアーゼによる切断に限られず、その他の手段による切断に係る方法について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

なお、請求の範囲が明確に記載されておらず、また、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない上記請求の範囲に係る発明については、国際調査を行っていない。

請求の範囲 2 4

上記請求の範囲における「動物」は、ヒトを含むものであると認められる。

請求の範囲 2 8、3 0－3 2

上記請求の範囲における「弾性線維形成調節剤」及び「DNACE 特異的プロテアーゼ」は、具体的にどのような化合物であるか不明である。したがって、上記請求の範囲は明確に記載されているとはいえず、また、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

なお、請求の範囲が明確に記載されておらず、また、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない上記請求の範囲に係る発明については、調査を行っていない。

請求の範囲 3 3

上記請求の範囲における「キット」は、何に使用するためのものか不明である。また、ポリヌクレオチドをどのように使用するか不明である。したがって、上記請求の範囲は明確に記載されているとはいえず、また、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

請求の範囲 16-21、25-28、33

上記請求の範囲における「DANCE 複合体」、「DANCE 複合体の調製方法」、「DANCE 複合体の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法」並びに「キット」は、何に使用されるものか不明である。

実施例等を見ても、DANCE が複合体を形成することは示されているものの（実施例 5）、DANCE 複合体と弾性線維形成の調節との相関関係については示されていない。

そうしてみると、DANCE 複合体の形成の調節が、弾性線維形成の調節と関連しているとはいえず、DANCE 複合体の形成を調節し得る物質が弾性線維形成調節剤であるとはいえず、該物質のスクリーニング方法（請求の範囲 25）は何に使用するものか不明である。また、該スクリーニング方法に使用する DANCE 複合体等は、有用性が不明である。

第Ⅲ欄について

請求の範囲 1-15,22-24,29-32,34 に記載された発明は、DANCE 特異的プロテアーゼによる DANCE の切断により得られるポリペプチドに係るものであり、一方、請求の範囲 16-21,25-27 に記載された発明は、DANCE の複合体に係るものである。してみれば、両発明群の共通事項は、DANCE に係ることであるが、この点は、例えば、以下の文献に記載されているように公知である。

T. Nakamura, et. al, DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon-injured arteries, J Biol Chem, 274(32), 1999, 22476-83

よって、請求の範囲 1-15,22-24,29-32,34 に記載された発明と請求の範囲 16-21,25-27 に記載された発明とは、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、異なる 2 の発明からなる発明群であると認められる。また、請求の範囲 28,33 は、それぞれ異なる 2 の発明を含むと認められる。